



HAL
open science

Adsorption des protéines sur les surfaces de couches minces de silice seules ou additivées de nanoparticules d'argent : impact sur les forces d'adhésion de *Candida albicans*

Marvine Soumbo

► To cite this version:

Marvine Soumbo. Adsorption des protéines sur les surfaces de couches minces de silice seules ou additivées de nanoparticules d'argent : impact sur les forces d'adhésion de *Candida albicans*. Matériaux. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30258 . tel-02985380

HAL Id: tel-02985380

<https://theses.hal.science/tel-02985380>

Submitted on 2 Nov 2020

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Marvine SOUMBO

Le 10 décembre 2019

Adsorption des protéines sur les surfaces de couches minces de silice seules ou additivées de nanoparticules d'argent : impact sur les forces d'adhésion de *Candida albicans*

Ecole doctorale : **GEET - Génie Electrique Electronique et Télécommunications : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :

LAPLACE - Laboratoire PLASma et Conversion d'Énergie - CNRS-UPS-INPT

LGC - Laboratoire de Génie Chimique - CNRS-UPS-INPT

Thèse dirigée par

Kremena MAKASHEVA et Christine ROQUES-CESCHIN

Jury

Mme Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, Professeure à l'AgroParisTech (rapporteuse)

M. Gaétan LAROCHE, Professeur à l'Université Laval, Québec (rapporteur)

Mme Nathalie TARRAT, Chargée de Recherche au CNRS (examinatrice)

M. Philippe TEULET, Professeur à l'Université Paul Sabatier (examinateur)

M. David RUCH, Directeur de Recherche au LIST, Luxembourg (examinateur)

Mme Lamia DREIBINE, Expert LIEBHERR-AEROSPACE (invitée)

Mme Christine ROQUES-CESCHIN, Professeure à l'Université Paul Sabatier (Directrice de thèse)

Mme Kremena MAKASHEVA, Directrice de Recherche au CNRS (Directrice de thèse)

Résumé

Dans de nombreux secteurs, l'adhésion microbienne sur les surfaces est la source de multiples impacts négatifs. Cette étape est considérée comme préliminaire au développement de biofilm et peut être influencée par la présence d'un film conditionnant engendré par l'adsorption des protéines sur la surface. Ainsi, les stratégies visant une intervention au moment de la phase initiale d'adhésion représentent une approche appropriée pour prévenir la biocontamination des surfaces et nécessitent une compréhension à l'échelle moléculaire. Dans ce contexte, les matériaux nanocomposites à base de nanoparticules d'argents (AgNPs) et de silice (SiO₂) apparaissent comme des outils pertinents. Ce travail de thèse porte sur l'utilisation de substrats nanocomposites possédant une monocouche d'AgNPs exposées à leurs surfaces ou enterrées dans une matrice de SiO₂^{plasma} à une distance contrôlée de quelques nanomètres de la surface afin d'explorer, d'une part l'adhésion de protéines modèles (Sérum Albumine Bovine, DsRed et Fibronectine) et leurs changements conformationnels et d'autre part, la cinétique de détachement de la levure *Candida albicans* dans les différentes conditions. Les AgNPs sont bien connues pour leurs activités antimicrobiennes et présentent de plus, des propriétés optiques permettant de détecter des signatures moléculaires à leurs proximités. Suite à l'application de la spectroscopie Raman exaltée de surface en utilisant les couches nanocomposites à base d'AgNPs, la détection de trois conformations de la DsRed (protéine fluorescente rouge) adsorbée et déshydratée sur les substrats plasmoniques a été possible. Les résultats obtenus montrent que les changements conformationnels des protéines avec une forte cohérence interne sont réversibles. En parallèle, nous avons évalué la dynamique d'organisation et le comportement de la SAB, de la Fn et de la DsRed en contact avec des couches minces de silice ou additivées d'AgNPs. Les mesures des angles de contact des gouttelettes de différentes concentrations protéiques ont montré une interaction hydrophile croissante avec la SiO₂th thermique. L'hydrophobicité de surface est modifiée pour les substrats nanocomposites. L'épaisseur et les propriétés optiques des couches protéiques adsorbées ont été évaluées par ellipsométrie spectroscopique. En fonction de la concentration de protéines dans solution les résultats montrent l'évolution d'une monocouche protéique non continue et non dense vers une monocouche plus compacte et plus complexe pour des concentrations élevées. Les images obtenues par microscopie en champs proche ont révélé une organisation protéique sous la forme d'un réseau de type « dentelle » avec la SAB, des structures de type « tiges » avec la DsRed et de type « ramifications » pour la Fn. Les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge montrent les pics caractéristiques de la structure secondaire des protéines. Enfin, l'influence des AgNPs

sur l'adhésion de *C. albicans* a été quantifiée *in vitro* en utilisant une méthode hydrodynamique permettant l'application de très faibles contraintes de cisaillement. Une adhésion marquée et maintenue en présence des AgNPs exposées à la surface a été observée. L'interaction avec des AgNPs enterrées à quelques nanomètres de la surface conduit à une forte diminution de l'adhésion de *C. albicans*. La présence d'une couche mince de SAB ou de Fn sur les différents nanocomposites se traduit par des modifications drastiques, avec une augmentation de l'adhésion dans le cas de la Fn et une diminution dans le cas de la SAB. Le travail réalisé démontre l'influence du conditionnement des surfaces sur leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que sur leur évolution au cours de la déshydratation, et leur capacité à être colonisées par des microorganismes.

Abstract

Microbial adhesion on solid surfaces is the source of multiple negative impacts in many areas. This step is considered prior to biofilm formation. It might be influenced by the presence of a conditioning layer generated after protein adsorption on the surface. Thus, strategies to act during the initial phase of microbial adhesion represent an appropriate approach to prevent biocontamination of solid surfaces. However, they require understanding of the underlying mechanisms at the molecular level. In this context, nanocomposite materials based on silver nanoparticles (AgNPs) and silica (SiO_2) appear as relevant tools. This thesis focuses on the use of nanocomposite thin layers containing a plan of AgNPs exposed on their surfaces or buried in a $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ matrix at a controlled distance of a few nanometers from the surface in order to explore, on the one hand, the adhesion of model proteins (Bovine Serum Albumin, DsRed and Fibronectin) and their conformational changes and secondly, the kinetics of detachment of the yeast *Candida albicans* under the different conditions. AgNPs are well known for their antimicrobial activities but also for their optical properties allowing detection of molecular signatures at their proximities. Following the application of surface-enhanced Raman spectroscopy using AgNP-based nanocomposite layers, the detection of three conformations of DsRed (red fluorescent protein) adsorbed and dehydrated on plasmonic substrates was achieved. The obtained results show that the conformational changes of proteins with a strong internal coherence are reversible. In parallel, we have evaluated the dynamics of the organization and behavior of BSA, Fn and DsRed in contact with thin silica layers or silica layers containing AgNPs. Contact angle measurements of droplets of different protein concentrations showed increasing hydrophilic interaction with thermal SiO_2^{th} . For the nanocomposite layers, the surface hydrophobicity is modified. The thickness and optical properties of the adsorbed protein layers were evaluated by spectroscopic ellipsometry. Depending on the protein concentration in solution the results show the evolution of a non-continuous and non-dense protein monolayer to a more compact and complex monolayer at high concentrations. The images obtained by near-field microscopy revealed a protein organization in "lace-like" network with BSA, "rod-like" structure with DsRed and "branching" type for Fn. The spectra obtained by infrared spectroscopy show the peaks, characteristic of the secondary structure of proteins. Finally, the influence of AgNPs on the adhesion of *C. albicans* was quantified *in vitro* using a hydrodynamic method allowing the application of very low shear stresses. Marked and maintained adhesion was observed in the presence of exposed AgNPs. The interaction with AgNPs buried in a few nanometers from the surface leads to a sharp

decrease in the adhesion of *C. albicans*. The presence of a thin layer of BSA or Fn on the different nanocomposites results in drastic changes, with an increase in the adhesion in the case of Fn and a decrease in the case of BSA. The work carried out demonstrates the influence of surface conditioning on their physico-chemical properties, as well as their evolution during dehydration, and their ability to be colonized by microorganisms.

Remerciements

Parti de mon île natale (la Désirade) il y a plus de 5 ans, je ne pensais pas pouvoir un jour obtenir le titre de Docteur de l'école doctorale GEET. Durant mon parcours de Master à l'UPS (Diagnostic microbiologique et approches innovantes), j'ai eu la chance d'effectuer un stage de six mois entre deux prestigieux laboratoires, le LGC et le LAPLACE. Ce stage m'a permis de côtoyer de nombreux doctorants et également de me rendre compte du réel travail qu'ils effectuent tous les jours. À la suite de mon stage, qui s'est très bien passé et grâce aux efforts de mes deux encadrantes, Christines Roques et Kremena Makasheva, j'ai pu débiter le doctorat, cette aventure pleine d'émotions en 2016. Ces trois ans étaient remplis de bons moments et même dans les périodes difficiles où les manips ne me donnaient pas entière satisfaction, j'ai pu résoudre ces différents problèmes grâce au soutien et à l'aide de toutes les personnes que j'ai rencontrées durant le doctorat.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé durant ces trois ans afin de surmonter les nombreux obstacles rencontrés pendant la thèse.

Tout d'abord, je souhaite remercier les différents membres du jury pour m'avoir permis de soutenir cette thèse. Les rapporteurs, Mme Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, Professeure à AgroParisTech et M. Gaétan LAROCHE, Professeur à l'Université Laval Québec. Je remercie également les examinateurs Mme Nathalie TARRAT, Chargée de Recherche au CNRS, M. Philippe TEULET, Professeur à l'Université Paul Sabatier M. David RUCH, Directeur de Recherche au LIST, Luxembourg. Je remercie également Mme Lamia DREIBINE, Expert LIEBHERR-AEROSPACE d'avoir participé à ce jury de thèse. Je remercie Philippe TEULET pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier mes deux directrices de thèse, Mme Christine ROQUES-CESCHIN, Professeure à l'Université Paul Sabatier et Mme Kremena MAKASHEVA, Directrice de Recherche au CNRS, pour votre confiance, mais également pour le temps que vous m'avez dédié, pour les connaissances que vous m'avez transmises pendant ces années de travail inoubliable à vos côtés.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire Laplace, l'équipe Matériaux et Procédés Plasmas, Christina Villeneuve-Faure, Bernard Despax, Simon Dap, Nicolas Naudé, Cédric Trupin, Benoît Schlegel, Benoît Lantin, Frédéric Sidor et tous les autres. Merci de

m'avoir très bien accueilli et de m'avoir permis de mener cette thèse dans les meilleures conditions. Mes remerciements vont également aux membres du département BioSyM du LGC, Marie-Carmen Monje, Sophie Pecastaings, et aux personnes du site Pharmacie, Cathy Feuillolay, Sandra Huc, Laila Haddioui, Jocelyne Bacaria, pour leurs disponibilités et leurs aides dans la réalisation des nombreuses manipulations côté microbiologie.

Mes remerciements vont également aux membres du CEMES, Adnen Mlayah, Robert Carles, Caroline Bonafos et Celine Marcelot pour leurs implications et leurs expertises dans les différents projets.

Merci également à toi, Stéphane Le Blond du Plouy pour ta patience et tes conseils pour l'acquisition des nombreuses images MEB.

Je pense également à mes amis collègues de galère du Laplace ou du LGC qu'ils soient présents ou partis, Alexandro Pugliara, Adriana Scarangella, Charles Rigoudy, Ali Hleli, Abdel Majid Kassir, Aurélien Pujol, Mohamed Houssat, Clémence Tyl, Cédric Djaou, Rémi Berard, Simon Guette-Marquet, pour leurs nombreuses discussions, leurs aides et leurs soutiens durant ces trois ans.

Je tiens de tout cœur à remercier mon père François Soumbo et ma Mère Devarieux Judith pour tout l'aide qu'ils m'ont apportée dans ma vie et durant ces trois ans. Merci pour votre soutien indéfectible, votre patience, vos nombreuses discussions et tout ce que vous faites pour moi depuis toujours. Merci à toi mon petit frère Ludrick Soumbo qui a cru en moi, pour ton soutien depuis le Canada. Je tiens également à remercier Mariah Pascal, et les membres de sa famille pour leur soutien au quotidien et l'aide qu'ils m'apportent depuis deux ans. Merci encore à vous Pamela et Mario Victor-Oscar pour vos conseils et votre soutien le jour de ma soutenance. Je remercie de tout mon cœur ma famille et tous mes amis qui m'ont soutenu et supporté jusqu'au bout et qui ont également parcouru des milliers de kilomètres pour pouvoir me soutenir le jour de ma soutenance.

A vous tous, votre présence a rendu ce moment inoubliable et je vous en serai toujours reconnaissant. Merci, merci, merci encore pour tout.

Listes des acronymes

AA : acides aminés	EPS : Substances polymériques extra-cellulaire
AB : acide-base de Lewis	
ADN : Acide Désoxyribonucléique	EPPI : Eau Pour Préparation Injectable
AFM : Atomic Force Microscope	EM : Mécanisme électromagnétique
ALS : Agglutinin-like sequence	FDA : Food Drug Administration
Ag : Argent	FDTD : Finite-Difference Time-Domain
AgCl : Chlorure d'argent	Fn : Fibronectine plasmatique humaine
AgNPs : Nanoparticules d'argent	FP : Fluorescent Protein
Ag ₂ O : Oxyde d'argent	FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
Ag ₂ S : Sulfure d'argent	FWHM : Full Width at Half Maximum
ARN : Acide Ribonucléique	GFP : Green Fluorescent Protein
CCD : Charge Coupled Device	Gln : Glutamine
CEMES : Centre d'élaboration de matériaux et d'études structurales	Gly : Glycine
Cys : Cystéine	GRAS : Generally Recognized As Safe
CS ₂ : Disulfure de carbone	H ₂ S : Sulfure d'hydrogène
DBD : Décharge à barrière diélectrique	HMDSO : Hexaméthylidisiloxane
DFT : Density Functional Theory	HSMC : Cellule musculaire lisse humaine
DO : Densité optique	LAPLACE : Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie
DsRed : <i>Discosoma</i> Rouge Fluorescente	LGC : Laboratoire de Génie Chimique
EL : Interactions électrostatiques	LPS : Lipopolysaccharides

LSPR : Localized Surface Plasmon
Resonance

LW : Lifshitz-Van der Waals

MEB : Microscopie électronique à balayage

MPP : Matériaux et Procédés Plasma

MEC : Matrice extracellulaire

OCS : Sulfure de carbone

PECVD : Plasma Enhanced Chemical Vapor
Deposition

PL : Photoluminescence

PLL : Poly-L-lactide

pI : point isoélectrique

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PVD : Physical Vapor Deposition

QS : Quorum sensing

RF : Radiofréquence

ROS : Espèces oxygénées réactives

SAB : Sérum Albumine Bovine

SAH : Sérum Albumine Humaine

SAM :

SCFS : Single Cell Force Spectroscopy

SERS : Spectroscopie Raman exaltée de
surface

SiO₂th : Silice thermique

TO : Optique transve

TIAC : Toxi-infections nosocomiales
collectives

Tyr : Tyrosine

TEOS : Tétrahéoxysilane

Index des figures

Chapitre I

- Figure I-1 : (a) Représentation schématique et (b) observations en microscopie électronique à balayage (MEB) des différentes morphologies de *C. albicans* (Hawser and Douglas, 1994; Thompson *et al.*, 2011).....33
- Figure I-2 : Pourcentages des espèces de *Candida* isolées dans les cas de candidoses systémiques entre 1997 et 2007 (Pfaller *et al.*, 2010).....34
- Figure I-3 : Représentation schématique des principales étapes menant à la formation du biofilm de *C. albicans* sur une surface solide : ① et ② l'adhésion réversible et irréversible, ③ la phase intermédiaire de croissance, ④ la phase de maturation et ⑤ la dispersion des blastospores (adapté de (Finkel and Mitchell, 2011)).....36
- Figure I-4 : Les différents types d'interactions impliquées dans l'adhésion cellulaire en fonction de la distance de séparation entre le microorganisme et la surface (Pierre, 2010).....38
- Figure I-5 : Représentation schématique des facteurs influençant l'adhésion microbienne initiale à l'interface solide-liquide. Le résultat du processus d'adhésion est régi par l'interaction des propriétés du microorganisme, de la surface solide et du milieu liquide environnant adapté de (Cheng *et al.*, 2019).....49
- Figure I-6 : (a) Structure secondaire de la SAB avec les d'hélices α colorées en violet et les feuillets β en rose et (b) la SAB sous sa forme N, F et E (Lartundo-Rojas, 2007).....55
- Figure I-7 : Représentation schématique de la structure de la Fn. La structure protéique présentée ici est composée de 2240 acides aminés (numéro d'accession [B7ZLE5](https://www.uniprot.org/uniprot/B7ZLE5) sur unitProt.org <https://www.uniprot.org/uniprot/B7ZLE5>).....56
- Figure I-8 : (a) Structure secondaire de la Dsred a été obtenue avec Jmol avec la séquence fournie par Biovision, (b) les cinq étapes de la formation du chromophore de la Dsred et (c) le chromophore de la DsRed.....57

Figure I-9 : Représentation schématique des différentes techniques impliquées dans les études de détachement cellulaire sur une population cellulaire ou une cellule unique adapté de (Ahmad Khalili and Ahmad, 2015).....	61
Figure I-10 : Représentation schématique des mesures d'adhésion cellulaire par centrifugation. Une plaque multipuits est scellée avec des puits orientés vers l'extérieur. La force centrifuge agissant au fond des puits est appliquée sur les cellules pour provoquer leur détachement (Christ and Turner, 2010).....	63
Figure I-11 : Représentation schématique d'une expérience de détachement cellulaire sur disque rotatif. Le disque est en rotation à l'intérieur d'une chambre remplie d'une solution tampon. Les contraintes de cisaillement s'exercent ainsi sur les cellules adhérees à la surface du disque. La contrainte de cisaillement augmente linéairement au fur et à mesure qu'on s'éloigne du centre du disque (Christ and Turner, 2010).....	64
Figure I-12 : Schéma de la chambre à écoulement radial. Le flux entre dans la chambre circulaire à partir du centre et se déplace vers l'extérieur entraînant une contrainte de cisaillement sur les cellules collées sur la surface inférieure. Dans cette configuration la contrainte de cisaillement diminue de manière non linéaire lorsque la distance radiale augmente (Christ and Turner, 2010).....	65
Figure I-13 : Schéma de la chambre d'écoulement à plaques parallèles. Le flux entre à une extrémité et traverse le canal en appliquant une contrainte de cisaillement aux cellules adhérees sur le fond (Christ and Turner, 2010).....	66
Figure I-14 : Exemple d'illustration d'une puce de laboratoire possédant un canal microfluidique pouvant être fonctionnalisé. L'entrée du canal est connectée à un réservoir contenant une suspension microbienne et la sortie du canal à un pousse seringue (Cheung <i>et al.</i> , 2010).....	67
Figure I-15 : Structure typique des AgNPs avec un noyau polymorphe d'argent métallique et une couche de recouvrement continue ou discontinue (coquille). Les doubles flèches représentent les réactions qui peuvent se produire entre la coquille (organique ou inorganique) ou le noyau d'argent (directement ou indirectement) avec l'environnement et aussi à l'interface entre le noyau et l'enveloppe (Levard <i>et al.</i> , 2012).....	71

Figure I-16 : Comportement antimicrobien des AgNPs en fonction de la taille, exprimé en termes de toxicité sur la base d'une teneur totale équivalente en masse d'argent (Sotiriou <i>et al.</i> , 2011).....	72
Figure I-17 : Images MET d'une section ultra-mince de <i>S. cerevisiae</i> après contact avec le revêtement contenant du nano-argent ; (a) vue large ; b) vue détaillée de la paroi cellulaire et d'une partie du cytoplasme (Despax <i>et al.</i> , 2011).....	73
Figure I-18: Schéma récapitulatif illustrant l'interaction des AgNPs avec des cellules bactériennes (Vimbela <i>et al.</i> , 2017).....	74
Figure I-19 : Spectres FTIR bruts des levures <i>S. cerevisiae</i> , au niveau de la région 1800 – 800 cm ⁻¹ , enregistrés sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e). (a) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de nitrate d'argent (2 mM d'AgNO ₃ , dans de l'eau osmosée ; Guillemot <i>et al.</i> , 2008) ; (b) échantillon « contrôle » correspondant aux levures « fraîches », cultivées en milieu YPD gélosé puis resuspendues dans de l'eau déionisée ; (c) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0.15 M) ; (d) échantillon « témoin » correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée en solution saline (Saulou <i>et al.</i> , 2010); (e) échantillon correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline (Saulou <i>et al.</i> , 2010). Les décalages des bandes amide I et amide II dans le cas des levures après contact avec le dépôt nano composite (e), par rapport aux levures « contrôle » viables (b) et aux levures « contrôle » mortes (a), sont indiqués sur la figure (Saulou, 2009; Saulou <i>et al.</i> , 2010).....	75
Figure I-20: Résumé schématique des phénomènes affectant la dissolution des AgNPs dans l'eau (Le Ouay and Stellacci, 2015).....	81
Figure I-21 : Image de plusieurs plasmas naturels (a et b) et d'un plasma créé artificiellement en laboratoire (c et d).....	86
Figure I-22 : Evolution spatiale du potentiel du plasma dans l'espace inter-électrode (Pugliara, 2016).....	88

Figure I-23 : Image MEB d'une unique couche d'AgNPs déposée sur une couche de SiO ₂ sur un substrat de Si. Observation inclinée à 30°. Densité des AgNPs de $3.6 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ et taille moyenne de 20 nm. (Makasheva <i>et al.</i> , 2013).....	90
Figure I-24 : Images MET en champ clair d'une vue plane des substrats nanocomposites obtenus avec 2 puissances (a) 40W et (b) 80W et un temps de pulvérisation fixé $t_s = 5$ s, et pour 2 temps (c) 10 s et (d) 30 s et une puissance injectée fixée $P = 10W$ (Pugliara <i>et al.</i> , 2015).....	91
Figure I-25 : Structure moléculaire de l'hexaméthylsiloxane (HMDSO, C ₆ H ₁₈ OSi ₂).....	92
Figure I-26: Spectres FTIR de couches minces organosiliciée et silice, élaborées par plasma à partir d'HMDSO pour la première et d'un mélange HMDSO et O ₂ pour la SiO ₂ au LAPLACE (Makasheva <i>et al.</i> , 2016).....	93
Figure I-27 : Images MET en vue transversale des AgNPs enterrées dans une matrice amorphe d'hydrocarbure oxygénée (Körner <i>et al.</i> , 2010). La taille et la densité des AgNPs diminuent en fonction de l'épaisseur de la couche (voir la flèche rouge) à cause du phénomène d'empoisonnement de la cible métallique.....	95
Figure I-28 : Images MET d'une couche mince organosiliciée contenant des AgNPs déposée sur un substrat de silicium ; (a) vue transversale; (b) image haute résolution qui permet de voir la cristallinité des AgNPs ; (c) histogramme de la taille des AgNPs (fraction volumique = 0,39) ; (d) image associée de microdiffraction électronique (Despax <i>et al.</i> , 2011).....	96
Figure I-29 : Image MET en champ clair en section transverse d'un échantillon élaboré par pulvérisation d'argent suivie par PECVD. Conditions : $t_s = 5$ s, $P = 40$ W ($V_{dc} = -750$ V). Le temps de dépôt du SiO ₂ plasma est $t_d = 60$ s. En insert, image MEHR d'une AgNP (Taille des AgNPs = 11.1 ± 2.4 nm) (Pugliara <i>et al.</i> , 2015).....	97
Figure I-30 : (c)-(d) Zoom MET-XS en vue transversale en champ clair sur la partie supérieure des couches nanocomposites et (g)-(h) images MET en vue plane des échantillons exploités pour la mesure de la libération d'argent et taille-distribution associé.....	98

Chapitre II :

Figure II-1 : Schéma récapitulatif du principe de dépôt par procédé plasma RF du film composite, constitué de nanoparticules d'argent incluses dans la matrice organosiliciée.....	108
Figure II-2 : Image MET en vue plane observée en champ clair du plan des AsNPs (Pugliara <i>et al.</i> , 2015; Pugliara <i>et al.</i> , 2016).....	109
Figure II-3 : Images MEB (a) vue plane et (b) coupe transversale d'une couche nanocomposite élaborée par procédé plasma, contenant des AgNPs enterrées dans une matrice de silice à une distance contrôlée de la surface (Pugliara <i>et al.</i> , 2015).....	110
Figure II-4 : Mouillabilité d'une surface solide par un liquide et représentation des forces appliquées sur la goutte déposée.....	115
Figure II-5 : Photographie d'un microscope optique simple et de son schéma constitutif (Chen, 2014).....	116
Figure II-6 : Schéma du trajet des électrons dans un microscope électronique à balayage. Après avoir été focalisés par des lentilles les électrons frappent l'objet et des électrons secondaires sont émis et collectés afin de reconstituer l'image (Williams, 2006).....	117
Figure II-7 : États de polarisation après les différents éléments d'un ellipsomètre à modulation par polariseur tournant. La polarisation devient rectiligne après que le faisceau a traversé le polariseur et elliptique après réflexion sur la surface de l'échantillon. Enfin, elle redevient linéaire après l'analyseur (Borella, 2006).....	118
Figure II-8 : Les différents modes de vibration d'une molécule (Saulou, 2009).....	120
Figure II-9 : Principe de la spectroscopie Raman (Saulou, 2009).....	121
Figure II-10 : Schéma représentant les dimensions du support de contenance.....	122
Figure II-11 : Schéma d'une vue de face de la structure de la chambre à écoulement cisailé.....	124
Figure II-12 : Schéma représentant une vue éclatée de la chambre a écoulement cisailé.....	124

Figure II-13 : Représentation schématique de l'ensemble du dispositif d'évaluation du détachement cellulaire.....125

Chapitre III

Figure III-1 : (a) Représentation schématique de la protéine fluorescente tétramérique DsRed, de sa structure et (b) principaux niveaux d'énergie électronique de son chromophore.....131

Figure III-2 : Séquence peptidique de la DsRed (numéro d'accèsion Q9U6Y8 sur unitProt.org, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9U6Y8>). En rouge, est coloré le chromophore de la DsRed composé des trois acides aminés (66Gln-67Tyr-68Gly, QYG).....131

Figure III-3 : Spectres Raman enregistrés sur un substrat de quartz vierge (ligne noire) et sur une couche mince de DsRed adsorbée et déshydratée sur un substrat de quartz (ligne rouge).....133

Figure III-4 : Spectres de photoluminescence (PL) de gouttelettes de DsRed déshydratées sur la surface de la silice thermique (SiO_2^{th}) pour différentes concentrations de solutions de DsRed à pH = 7.0 et à 23°C. La figure en insert représente l'intégrale de la fluorescence en fonction des concentrations de DsRed.....134

Figure III-5 : (a) Image MET en coupe transversale à champ clair montrant la couche unique d'AgNPs avec sa couche de couverture en silice conforme de 5.5 nm d'épaisseur ; (b) Image MET en vue plane en champ clair des AgNPs.....135

Figure III-6 : Spectre d'absorption du substrat plasmonique à base d'AgNPs, expérimental (ligne bleue) et théorique (ligne noire), et de la protéine de DsRed (ligne rouge).....137

Figure III-7 : Spectres Raman enregistrés sur une couche mince de DsRed adsorbée et déshydratée sur la surface du substrat plasmonique à base d'AgNPs pour différentes longueurs d'onde d'excitation.....138

Figure III-8 : Représentation des trois différentes configurations (A, B et C) du chromophore de la DsRed. Les acides aminés formant le chromophore de la DsRed ont été reporté sur la configuration A.....140

- Figure III-9 : Spectre SERS de la couche protéique déshydratée de DsRed déposée à partir d'une solution dont la concentration protéique est de 0.05 g l^{-1} (400 nM) (ligne noire) et spectre Raman simulé par DFT du chromophore de la DsRed dans la configuration A (ligne rouge). Les pics Raman identifiés sont également présentés.....141
- Figure III-10 : (1) Représentation des trois configurations (A, B et C) du chromophore de la DsRed. (2) Spectres SERS expérimentaux (spectres supérieurs) et spectres Raman simulés par DFT (spectres inférieurs) des couches déshydratées de DsRed élaborées à partir d'une solution contenant (a) 0.01 g l^{-1} (80 nM), (b) 0.05 g l^{-1} (400 nM) et (c) 0.1 g l^{-1} (800 nM) de DsRed. Les spectres Raman ont été enregistrés avec un temps d'accumulation de 30 s. Les diagrammes à secteurs représentant la répartition de la population des configurations A, B et C, sont rapportés dans les encarts pour chaque concentration protéique.....144
- Figure III-11 : Evolution temporelle des intensités des spectres Raman intégrées après soustraction du signal de fond. Les spectres ont été acquis avec un temps d'accumulation de 30 s. Les mesures ont été effectuées avec la couche mince de DsRed élaborée à partir d'une solution de DsRed de concentration égale à 0.1 g l^{-1} (800 nM).....145

Chapitre IV

- Figure IV-1 : Représentation schématique du processus de déshydratation pour : (a) une gouttelette d'eau ou (b) une gouttelette protéique déposée à la surface d'une couche mince de SiO_2^{th} . Le volume d'eau évaporé est représenté par une couleur pâle.....152
- Figure IV-2 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes ($3.8 \mu\text{L}$) de DsRed (gamme de concentrations $0.01\text{-}1 \text{ g/L}$) sur la SiO_2^{th} à $23 \text{ }^\circ\text{C}$153
- Figure IV-3 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes ($3.8 \mu\text{l}$) de SAB (gamme de concentrations $0.01\text{-}5 \text{ g/L}$) sur la SiO_2^{th} à $23 \text{ }^\circ\text{C}$154

- Figure IV-4 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes (3.8 μ l) de Fn (gamme de concentrations 0.01-5 g/L) sur la SiO₂th à 23 °C.....154
- Figure IV-5 : Représentation schématique du processus de déshydratation d'une gouttelette protéique déposée sur la SiO₂th: (a) évolution de la gouttelette lors de la déshydratation et (b) état final après déshydratation complète.....159
- Figure IV-6 : Images MEB du rebord et du centre d'une gouttelette de Fn (0.05 g/L) déshydratée sur la SiO₂th. Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 1000$, $\times 3000$, respectivement. Ligne du bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, $\times 10000$, respectivement.....160
- Figure IV-7 : Images MEB du rebord d'une gouttelette de SAB (0.05 g/L) déshydratée sur la SiO₂th. Les images successives correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, respectivement.....160
- Figure IV-8 : Image MEB de la DsRed (c= 0.05 g/L, à pH=7) adsorbée et déshydratée (23 °C) sur la surface de la SiO₂th.....161
- Figure IV-9 : Micrographies optiques (images pseudocouleur) de couches minces de SAB élaborées avec différentes concentrations de solutions : (a) 0.1 g/L (b) 0.5 g/L (c) 1.0 g/L et (d) 5.0 g/L après adsorption et déshydratation à température ambiante et à pression atmosphérique sur des substrats de SiO₂th de 100 nm d'épaisseur. Toutes les micrographies ont été acquises avec un grossissement $\times 500$164
- Figure IV-10 : Ligne du haut : Couche mince de SAB élaborée avec une solution protéique de concentration 0.05 g/L, après adsorption et déshydratation des protéines à température ambiante et à pression atmosphérique, sur des substrats de SiO₂th de 100 nm d'épaisseur. (a) Micrographie optique en pseudocouleur, en insérant une image de la SAB, (b) Mesures AFM effectuées sur une région de 100 μ m \times 100 μ m, (c) Mesures AFM effectuées sur une région de 10 μ m \times 10 μ m (en insert l'histogramme de hauteur). Ligne du bas : Couche mince de DsRed (0.05 g /L) (d)

images optiques en pseudocouleur, avec une image insérée représentant la DsRed (e) Mesures AFM sur une région de 100 μm \times 100 μm , (f) Mesures AFM sur une région de 10 μm \times 10 μm (en insert l’histogramme de hauteur).....166

Figure IV-11 : Mesures AFM effectuées en mode PF-QNM de la couche mince de Fn (solution à 0.05 g/L) adsorbée et déshydratée sur une couche de SiO₂th. Les images (a) topographiques et (b) cartographie de propriétés, correspondent aux mesures réalisées sur une région de 5 μm \times 5 μm de la couche mince protéique. L’insert de l’image (a) correspond à la représentation schématique de la structure d’un brin de Fn.....167

Figure IV-12 : Spectres d’absorption de la solution de SAB (0.5 g/L) et de DsRed (0.05 g/L). Le pic d’absorption à 280 nm, en commun avec les deux solutions, a été attribué aux transitions $\pi - \pi^*$ dans les résidus d’acides aminés aromatiques. Alors que la SAB est transparente dans le visible, la DsRed présente deux pics d’absorption convolués liés aux chromophores constituant la protéine.....170

Figure IV-13 : Spectres FTIR d’une couche mince de DsRed (rouge) (solution de 1.0 g/L), de SAB (bleue) (solution de 5.0 g/L) et de Fn (vert) (solution de 1.0 g/L), déshydratée sur une surface de SiO₂.....173

Figure IV-14 : Représentation schématique des tests de mouillabilité effectués sur une couche mince protéique avec γ_{SL} l’interface solide-liquide, γ_{SV} l’interface solide-vapeur et γ_{LV} l’interface liquide-vapeur, θ_A correspond à l’angle de contact.....174

Figure IV-15 : (a) Mesures des angles de contact en fonction du temps de gouttelettes d’EPPI déposées à la surface de couches minces de SAB ou de DsRed déshydratées (0.05 g/L). (b) Comparaison entre les valeurs d’angle de contact d’EPPI et l’épaisseur de la couche mince protéique déshydratée de SAB ou de DsRed formée à la surface de la SiO₂th.....175

Figure IV-16 : Représentation schématique des scores de GRAVY pour les trois protéines utilisées et indication de la nature des protéines. Les scores ont été calculés à l’aide des séquences peptidiques des protéines avec le programme « java the sequence manipulation suite » https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html. Les scores représentés sur l’axe ne sont pas à l’échelle.....177

- Figure IV-17 : Évolution de la mesure de l'angle de contact de gouttelettes de SAB ou de Fn durant le processus de déshydratation, (moyenne \pm ET, n=3). Les gouttelettes protéiques (0.05g/L) ont été déposées sur une couche mince de SiO₂^{plasma} dans laquelle sont enterrées des AgNPs.....180
- Figure IV-18 : Évolution de la mesure de l'angle de contact de gouttelettes de SAB et de Fn (c= 0.05 g/L) en fonction du temps sur la SiO₂ avec présence d'une monocouche d'AgNPs exposées à la surface (moyenne \pm ET, n=3).....182
- Figure IV-19 : Images MEB d'une gouttelette de SAB (c= 0.05 g/L) déshydratée à la surface du substrat nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de SAB déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, $\times 30\ 000$, respectivement. Ligne du bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de SAB déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 3000$, $\times 10\ 000$, $\times 100\ 000$, respectivement.....183
- Figure IV-20 : Images MEB d'une gouttelette de Fn (c= 0.05 g/L) déshydratée à la surface du substrat nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 1000$, $\times 1000$, $\times 3000$, $\times 30\ 000$, respectivement. Ligne du Bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 1000$, $\times 3000$, $\times 10\ 000$, $\times 30\ 000$, respectivement.....184
- Figure IV-21 : Images MEB d'une couche mince de SAB (0.05 g/L) sur substrat nanocomposite avec des AgNPs exposées à la surface.....185
- Figure IV-22 : Images MEB d'une couche mince de Fn (0.05 g/L) sur substrat nanocomposite avec des AgNPs exposées à la surface.....186

Figure IV-23 : Mesures de l'angle de contact à 23 °C au cours du processus de déshydratation des gouttelettes de suspension de *C. albicans* (culture 48H à 22.5 °C ou 37°C, filtrée ou non) sur une couche mince de SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).....187

Chapitre V

Figure V-I : Profils de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées : couche mince de SiO₂th seule (en noir), couche mince de SiO₂th avec une couche protéique de SAB (après adsorption et déshydratation) (en bleu), couche mince de SiO₂th avec une couche protéique de Fn (après adsorption et déshydratation) (en rouge) (moyenne ± écart-type ; n = 3).....193

Figure V-2 : Profils de détachement de *C. albicans* sur différents nanocomposites à base de SiO₂ et d'AgNPs dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne ± écart-type ; n = 3).....196

Figure V-3 : Pourcentages de levures viables et non viables au début de l'expérimentation et après la phase d'adhésion à la surface du nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Les cellules vivantes sont représentées en vert et les cellules endommagées ou mortes en rouge. Les pourcentages de levures viables ou non, présentes au début de l'expérimentation ont été calculés sur une moyenne de 335 levures. Les pourcentages ont été calculés sur une moyenne de 150 levures après l'application d'une contrainte de cisaillement de 0.2 Pa (moyenne ± écart-type ; n = 3).....198

Figure V-4 : Pourcentages de levures viables et non viables au début de l'expérimentation et après la phase d'adhésion à la surface du nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs enterrées sous la surface. Les cellules viables sont représentées en vert et les cellules non viables ou endommagées en rouge. Les pourcentages de cellules viables ou non présentes au début de l'expérimentation ont été calculés sur une moyenne de 317 levures. Les pourcentages de cellules adhérentes sur le nanocomposite ont été calculés sur une moyenne de 110 levures après l'application d'une contrainte de 0.2 Pa, (moyenne ± écart-type ; n = 3)..199

Figure V-5. Influence de la présence d'une couche mince de SAB adsorbée et déshydratée sur les différents nanocomposites sur le profil de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne \pm écart-type ; n = 3).....200

Figure V-6 : Influence de la présence d'une couche mince de Fn adsorbée et déshydratée sur les différents nanocomposites sur les profils de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne \pm écart-type ; n = 3).....203

Index des tableaux

Chapitre I

- Tableau I-1 : Tableau de synthèse des caractéristiques de la SAB et de la Fn utilisées pour l'étude de l'adsorption protéique.....58
- Tableau I-2 : Comparaison des avantages et inconvénients impliqués lors de l'utilisation de techniques permettant la mesure de la force d'adhésion cellulaire. En rose, la méthode sélectionnée : chambre à écoulement parallèle.....68
- Tableau I-3 : Récapitulatif des modes d'action des AgNPs et des ions Ag⁺ au niveau de la membrane et du cytoplasme cellulaire.....82

Chapitre II

- Tableau II-1 : Correspondance entre les débits appliqués avec le pousse-seringue et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement.....127
- Tableau II-2 : Correspondance entre les débits appliqués avec la pompe péristaltique et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans la chambre d'écoulement.....127
- Tableau II-3 : Tableau de synthèse des essais réalisés en fonction des différentes protéines utilisées.....128

Chapitre IV

- Tableau IV-1 : Suivi dynamique de la déshydratation de différentes gouttelettes protéiques par mesure des angles de contact en fonction du temps à 23 °C (moyenne ± ET, n=3).....151
- Tableau IV-2 : Angles de contact de différentes gouttelettes protéiques (DsRed, SAB et Fn) de concentrations croissantes (0.01-5 g/L) déposées sur la SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).....153

Tableau IV-3 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de DsRed (gamme de concentration de 0.05-1 g/L) déposées sur la SiO ₂ th . Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	155
Tableau IV-4 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de SAB (gamme de concentration de 0.01-5 g/L) déposées sur la SiO ₂ th . Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	156
Tableau IV-5 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de Fn (gamme de concentration de 0.01-1 g/L) déposées sur la SiO ₂ th . Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	157
Tableau IV-6 : Caractéristiques des gouttelettes de DsRed (0.05 g/L) déposées sur la SiO ₂ th dans une gamme de pH de 3 à 11 avec T = 23 °C. Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	162
Tableau IV-7 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB (0.05 g/L) déposées sur la SiO ₂ th dans une gamme de pH de 3 à 11 et avec T = 23 °C. Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	163
Tableau IV-8 : Mesures ellipsométriques des couches minces déshydratées de SAB et de DsRed élaborées avec des solutions de concentrations 0.0.1 à 5 g/L déposées sur la SiO ₂ th (moyenne ± ET, n=3).....	168
Tableau IV-9 : Récapitulatif des mesures d'angle de contact de gouttelettes d'EPPI déposées sur les différentes couches protéiques (a) de SAB et (b) de SAB ou de DsRed (0.05g/L). L'épaisseur des différentes couches protéiques sur lesquelles a été déposée la gouttelette d'EPPI est également rapportée.....	166
Tableau IV-10 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB ou de Fn (0.05 g/L, pH=7.0) déposées sur les substrats nanocomposites possédant des AgNPs enterrées dans une matrice de SiO ₂ ^{plasma} (mesures à 23 °C). Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	168
Tableau IV-11 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB et de Fn (0.05 g/L, pH=7.0) déposées à la surface des substrats nanocomposites avec des AgNPs exposées à la surface (mesures à 23 °C). Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).....	181

Tableau IV-12 : Angles de contact de gouttelettes de suspension de <i>C. albicans</i> (culture 48H à 22.5 °C ou 37 °C) déposée sur une couche mince de SiO ₂ th (moyenne ± ET, n=3).....	187
--	-----

Chapitre V

Tableau V-1. Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) sur la surface d'une couche mince de SiO ₂ th en présence ou absence de protéines de SAB ou Fn adsorbées et déshydratées (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % ($\tau_{p\ 2\ \%}$ (Pa)), 50 % ($\tau_{p\ 50\ \%}$ (Pa)) et 90 % ($\tau_{p\ 90\ \%}$ (Pa)) des levures initialement adhérees.....	195
---	-----

Tableau V-2. Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) sur les différents substrats nanocomposites (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % ($t_{p\ 2\ \%}$ (Pa)), 50 % ($t_{p\ 50\ \%}$ (Pa)) et 90 % ($t_{p\ 90\ \%}$ (Pa)) des levures.....	197
---	-----

Tableau V-3. Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) en présence de protéines de SAB adsorbées et déshydratées sur les différents substrats nanocomposites (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % ($t_{p\ 2\ \%}$ (Pa)), 50 % ($t_{p\ 50\ \%}$ (Pa)) et 90 % ($t_{p\ 90\ \%}$ (Pa)) des levures initialement adhérees.....	201
---	-----

Tableau V-4. Nombre de levures initialement adhérees (N ₀) en présence de Fn adsorbée et déshydratée sur les différents substrats nanocomposites (moyenne ± écart-type ; n = 3. Contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % ($t_{p\ 2\ \%}$ (Pa)), 50 % ($t_{p\ 50\ \%}$ (Pa)) et 90 % ($t_{p\ 90\ \%}$ (Pa)) des levures initialement adhérees.....	204
--	-----

Sommaire

Listes des acronymes	9
Index des figures	11
Index des tableaux	23
Sommaire	27
Chapitre I : État de l'art	31
1. Adhésion microbienne et formation du biofilm : Comment s'organise la vie des levures de <i>Candida albicans</i> sur les surfaces ?	31
1.1 Biologie et pathogénicité de la levure <i>Candida albicans</i>	33
1.2 Adhésion microbienne : Une étape cruciale dans la formation du biofilm	35
1.2.1 Transport des molécules et macromolécules et des microorganismes vers les surfaces	35
1.2.2 Différentes étapes de l'adhésion sur les surfaces et du développement du biofilm de <i>Candida albicans</i>	36
1.2.3 Régulation et perte de sensibilité	40
1.3 Influence des facteurs liés aux microorganismes, au milieu environnant et aux matériaux sur l'adhésion microbienne	41
1.3.1 Facteurs liés aux microorganismes	41
1.3.2 Facteurs liés à l'environnement	45
1.3.3 Facteurs liés aux matériaux	47
1.4 Implication de l'adsorption des protéines dans l'adhésion microbienne et la formation du biofilm	50
1.4.1 Interactions des protéines avec des surfaces solides	52
1.4.2 Les protéines utilisées : La sérum albumine bovine (SAB), la fibronectine plasmatique humaine (Fn) et la protéine fluorescente rouge DsRed	54
1.5 Méthodes d'étude de l'adhésion cellulaire sur une surface	60
2. Multifonctionnalité des nanoparticules d'argent et intérêts de leur utilisation dans la conception des couches minces nanocomposites	70
2.1 Activité antimicrobienne des AgNPs : Interaction des AgNPs avec des microorganismes	72
2.2 Propriétés optiques des AgNPs : résonance plasmonique	83
3. Elaboration par voie plasma de couches minces nanocomposites à base de SiO₂ contenant des AgNPs	84
3.1 Généralités sur les plasmas : phénomènes et grandeurs physiques	85
3.2 Utilisation de la pulvérisation pour la formation des AgNPs	89
3.3 Elaboration des couches minces de SiO ₂ par procédé plasma	91

3.4	Elaboration des couches minces nanocomposites de SiO ₂ contenant des AgNPs	93
Problématique et objectifs de la thèse		99
Chapitre II : Matériels et méthodes expérimentales		103
1.	Préparation de la suspension de <i>Candida albicans</i>	103
1.1.	Origine et conservation de <i>C. albicans</i>	103
1.2	Préparation des suspensions de travail	103
1.3	Préparation des suspensions microbiennes pour les analyses de viabilité cellulaire	104
2.	Préparation des différentes solutions protéiques :	105
2.1	Protéine <i>Discosoma</i> Rouge Fluorescente (DsRed)	105
2.2	Sérum Albumine Bovine (SAB)	105
2.3	Fibronectine plasmatique humaine (Fn)	105
2.4	Création des gammes de pH des solutions protéiques	105
3.	Création des couches minces protéiques	106
4.	Élaboration et structure des substrats étudiés :	106
4.1	Élaboration des couches minces de silice thermique (SiO ₂ th)	106
4.2	Élaboration des couches minces nanocomposites contenant des AgNPs par procédé plasma	107
4.2.1	Procédé plasma et description du réacteur plasma	107
4.2.2	Élaboration des couches minces avec des AgNPs exposées à la surface d'une couche mince de SiO ₂ th	108
4.2.3	Structure des nanocomposites avec AgNPs enterrées dans une couche de silice plasma	109
5.	Caractérisation physico-chimique et optique des gouttelettes et des couches minces protéiques déposées à la surface des substrats nanocomposites.....	110
5.1	Mesures de l'angle de contact	110
5.2	Caractérisation par microscopie optique et microscopie électronique à balayage (MEB)	110
5.3	Mesures des spectres de fluorescence	111
5.4	Mesures des spectres d'adsorption	111
5.5	Mesures de l'épaisseur des couches minces protéiques déshydratées par ellipsométrie	112
5.6	Mesures des spectres FTIR de gouttelettes protéiques déshydratées	112
5.7	Mesures des spectres Raman de la DsRed déshydratée	113
6.	Caractérisation des surfaces avec ou sans couches minces de protéines	113
6.1	Mouillabilité	113
6.2	Microscopie optique et électronique à balayage (MEB)	114
6.3	Ellipsométrie	117

6.4	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	118
6.5	Spectroscopie Raman	119
7.	Détermination du profil de détachement de <i>Candida albicans</i> par méthode hydrodynamique	121
7.1	Description et montage de la chambre à écoulement cisailé	121
7.2	Réalisation des essais de détachement cellulaire	124
7.3	Correspondance entre les débits appliqués avec le pousse-seringue et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement	125
7.4	Correspondance entre les débits appliqués avec la pompe péristaltique et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement.	126
8.	Récapitulatif des différentes techniques utilisées selon les surfaces et les protéines	127
Chapitre III : Détection des changements conformationnels des protéines adsorbées sur des surfaces solides par spectroscopie Raman exaltée.....		
129		
1.	Choix de la DsRed : propriétés optiques d'une couche protéique adsorbée et déshydratée	130
2.	Structure et morphologie des substrats plasmoniques à base d'AgNPs enterrées dans SiO₂ élaborés par plasma.....	135
3.	Interaction de la DsRed avec les substrats plasmoniques à base d'AgNPs et de SiO₂^{plasma}.	137
3.1	Réponse optique de la couche de DsRed adsorbée et déshydratée à la surface des substrats plasmoniques	137
3.2	Attribution des pics SERS des molécules de DsRed adsorbées et déshydratées sur les substrats plasmoniques à base d'AgNPs	139
3.3	Changements conformationnels et évolution temporelle de la DsRed adhérente sur les substrats plasmoniques à base d'AgNPs	143
4.	Conclusion.....	146
Chapitre IV : Analyses des propriétés de protéines adsorbées sur des couches minces nanocomposites.....		
149		
1.	Étude de l'interaction de gouttelettes protéiques (DsRed, SAB et Fn) avec une couche mince de SiO₂th	150
1.1	Adsorption et propriétés optiques des gouttelettes sessiles de DsRed, de SAB et de Fn	150
1.2	Caractérisation morphologique et structurale des protéines déshydratées	155
1.3	Étude de l'interaction des gouttelettes de DsRed ou de SAB avec la SiO ₂ th à différents pH (3-11)	161
2	Étude de l'interaction de couches minces protéiques déshydratées avec la SiO₂th	164
2.1	Morphologie des couches minces protéiques déshydratées	164
2.2	Etude des propriétés optiques des couches minces protéiques par ellipsométrie spectroscopique	167
2.3	Caractéristiques optiques et spectrales des couches minces déshydratées de DsRed, de SAB, et de Fn adsorbées sur la SiO ₂ th	169

2.4	Mesures de l'angle de contact de gouttelettes d'EPPI déposées sur une couche mince protéique déshydratée de SAB ou de DsRed	173
3.	Étude de l'interaction entre les protéines et des modèles de couches minces nanocomposites à base de SiO₂ et d'AgNPs	178
3.1	Caractérisation morphologique et structurale de gouttelettes protéiques déposées sur des couches minces nanocomposites avec des AgNPs enterrées	178
3.2	Caractérisation morphologique et structurale des protéines adsorbées et déshydratées sur des couches minces nanocomposites avec des AgNPs exposées à la surface	180
4	Dépôts de microorganismes : Adsorption et images optiques de gouttelettes de suspension de <i>C. albicans</i> déshydratées sur une couche mince de SiO₂th	186
Chapitre V : Adhésion de <i>C. albicans</i> sur des nanocomposites à base d'AgNPs et de SiO₂ avec ou sans la présence d'une couche mince protéique adsorbée et déshydratée		191
1.	Évaluation du profil de détachement de <i>C. albicans</i> adhérent à la surface d'une couche mince de SiO₂th en présence ou non de protéines adsorbées	193
2.	Adhésion de <i>C. albicans</i> sur une couche mince nanocomposite avec des AgNPs exposées ou enterrées à l'intérieur d'une matrice de SiO₂^{plasma}	196
3.	Influence des protéines (SAB ou Fn) adsorbées et déshydratées à la surface des différents substrats nanocomposites sur l'adhésion de <i>C. albicans</i>	200
3.1	Adhésion de <i>C. albicans</i> en présence de SAB adsorbée et déshydratée à la surface des nanocomposites	200
3.2	Adhésion de <i>C. albicans</i> en présence de Fn adsorbée et déshydratée à la surface des nanocomposites	202
4.	Conclusion	205
Conclusion générale et perspectives		207
Bibliographie		213
Annexes		249
Annexe A : Création des couches minces protéiques à l'aide de la méthode d'enduction par trempage		250
Annexe B : Contrôle de la viabilité des levures présentes au début de l'expérimentation de détachement cellulaire		251

Chapitre I : État de l'art

1. Adhésion microbienne et formation du biofilm : Comment s'organise la vie des levures de *Candida albicans* sur les surfaces ?

L'adhésion à des matériaux ou la floculation sous forme d'agrégats dans les fluides sont des propriétés classiques des microorganismes. L'adhésion, le regroupement et l'accumulation des microorganismes sur une surface solide conduisent à la formation de dépôts plus ou moins structurés, regroupés sous le terme de « biofilm microbien ».

Dans la nature, le biofilm est la forme d'existence microbienne la plus répandue. Ce sont des systèmes biologiques, complexes, structurés et dynamiques qui sont en général hétérogènes, c'est-à-dire formés de plusieurs types de microorganismes : bactéries, levures, algues unicellulaires, associés à des protozoaires, etc. Les biofilms sont donc ubiquitaires et présentent de nombreux aspects positifs. Ils assurent notamment des fonctions physiologiques primordiales aussi bien pour les végétaux que pour les organismes vivants supérieurs au sein duquel ils garantissent notamment la protection contre des pathogènes. Par ailleurs, leurs propriétés peuvent également être mises à profit dans les procédés de fermentation, la dégradation de substances polluantes dans les sols ou encore le traitement des effluents, etc. Cependant, la colonisation microbienne des surfaces est de plus en plus souvent identifiée comme la source de problèmes industriels et sociétaux sévères dans divers domaines. Les biofilms microbiens impliquant des microorganismes à potentiel pathogène qui se développent sur des surfaces de l'environnement d'un patient (lit, toilettes, lavabos, réseau d'eau ...) sont à l'origine de problèmes sanitaires graves en milieu hospitaliers. Ils peuvent être ainsi responsables d'infections nosocomiales dans le domaine médical et de toxi-infections nosocomiales collectives (TIAC) dans l'industriel agroalimentaire. L'organisation des microorganismes sous forme de biofilms peut être observée *in vivo*, notamment lors d'infections chroniques impliquant des pathogènes opportunistes. La résistance des biofilms aux traitements physiques et chimiques justifie actuellement la recherche active développée pour remédier à ces problèmes. Par conséquent, les stratégies visant à limiter et/ou inhiber la formation des biofilms dès la phase initiale d'adhésion représentent une approche pertinente pour prévenir la biocontamination des surfaces solides.

Le terme microorganisme regroupe un ensemble d'organismes invisibles à l'œil nu. Ils diffèrent par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie. Si l'on exclut les virus, il faut distinguer les procaryotes (du grec *pro*, avant, et *karyon*, amande) regroupant les bactéries (*Bacteria* ou *Eubacteria*) et les Archées (*Archaea*), et les Eucaryotes (*Eucarya*) (Verdier, 2015). Les procaryotes correspondent à des organismes unicellulaires relativement simples dont le matériel génétique est généralement constitué par un seul chromosome circulaire non entouré d'une enveloppe nucléaire. Le domaine des Bactéries regroupe les espèces les plus connues (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*...). Le domaine des Archées regroupe les procaryotes dont la paroi cellulaire ne contient pas de peptidoglycane. Elles vivent souvent dans des conditions environnementales extrêmes et sont le siège de processus métaboliques inhabituels. L'ensemble de ces microorganismes présente une grande diversité et occupe la plupart des niches écologiques disponibles sur terre (Chaban *et al.*, 2006). Par opposition, les cellules eucaryotes (du grec *eu*, vrai, et *karyon*, amande) ont un matériel génétique structuré en plusieurs chromosomes entourés d'une enveloppe ou membrane nucléaire, constituant ainsi le noyau, avec une morphologie plus complexe (présence d'organites intracellulaires) et sont habituellement plus grandes que les cellules procaryotes. Les eucaryotes correspondent aux cellules animales, aux cellules végétales (les plantes, mais également les algues unicellulaires), les protozoaires (unicellulaires), ainsi que les champignons. Ceux-ci sont également appelés Fungi ou Mycètes et incluent des organismes uni- (levures, ex : *Candida albicans*) ou pluricellulaires (des moisissures, ex : *Aspergillus* sp. aux champignons dits supérieurs, ex : le cèpe). Leur paroi cellulaire contient de la cellulose et de la chitine et ils sont dépourvus de chlorophylle et de mobilité. La reproduction des champignons peut être sexuée ou asexuée et se fait par la production de spores. Les organismes fongiques peuvent être constitués de cellules végétatives allongées et cloisonnées appelées hyphes. Plusieurs hyphes peuvent s'associer pour former une structure filamentaire plus épaisse : le mycélium, qui possède un grand pouvoir de pénétration et de dissémination dans le substrat colonisé. Dans cette thèse, on s'intéressera plus particulièrement à la levure *Candida albicans* qui fera l'objet d'une description plus détaillée dans la prochaine section, avant d'aborder la description de l'adhésion microbienne et de la formation du biofilm.

1.1 Biologie et pathogénicité de la levure *Candida albicans*

Les levures du genre *Candida* appartiennent au règne fongique, au phylum des Ascomycètes, à la classe des Saccharomycètes, à l'ordre des Saccharomycétales et à la famille des Saccharomycétacées. Le genre *Candida* dénombre plus de 300 espèces parmi lesquelles seule une minorité est rencontrée en pathologie humaine. Parmi cette minorité on peut citer les espèces suivantes : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. dubliniensis* (Akpan and Morgan, 2002). L'espèce la plus fréquente et de ce fait la plus étudiée est *C. albicans*. *C. albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, aérobie et diploïde dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes. Elle se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Au niveau morphologique, *C. albicans* peut mesurer de 3 à 15 µm et elle peut présenter différentes formes. Ce polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, *C. albicans* peut exister sous sa forme ovoïde unicellulaire, le blastospore ou appelée « type levure ». Elle peut également se transformer en une forme filamenteuse pluricellulaire appelée hyphe ou sous une troisième forme intermédiaire le pseudo-hyphes. Les pseudo-hyphes ressemblent à des blastospores allongées restant attachées entre elles (Fig. I-1). Ces formes cellulaires possèdent des propriétés et des fonctions différentes. Les blastospores seraient plus adaptées pour la dissémination et la survie commensale, alors que les hyphes favoriseraient l'invasion et la pénétration des tissus et les organes de l'hôte (Cannon *et al.*, 1995; Hazan *et al.*, 2002). La transition morphologique se fait en réponse à différents stimuli environnementaux (Cannon *et al.*, 1995; Leito *et al.*, 2009), tels que le pH, la température ou encore la présence de nutriments.

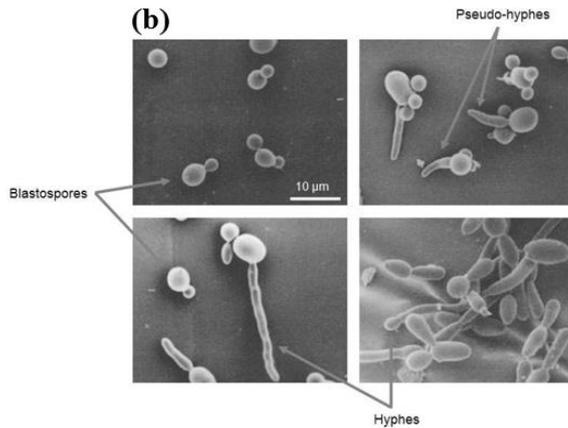
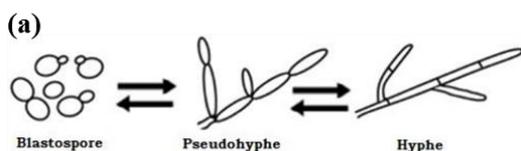


Figure I-1 : (a) Représentation schématique et (b) observations en microscopie électronique à balayage (MEB) des différentes morphologies de *C. albicans* (Hawser and Douglas, 1994; Thompson *et al.*, 2011).

Les levures du genre *Candida* sont isolées de la cavité orale de 20 à 75% de la population générale, sans symptomatologie associée. Cette levure vit également à l'état commensal dans le tube digestif et peut coloniser par contiguïté les voies génito-urinaires et respiratoires (Mavor *et al.*, 2005). En cas de dysfonctionnement du système immunitaire de l'hôte, ou de dysmicrobisme (déséquilibre des flores commensales), ces levures sont capables de proliférer anormalement et ainsi développer un caractère pathogène. Il s'agit donc d'un opportunisme pouvant causer une grande variété d'infections, nommées candidoses. Ces infections peuvent être superficielles au niveau de la peau et des muqueuses, systémiques au niveau des organes profonds (comme le foie ou les reins), ou encore correspondre à des septicémies (Douglas, 2003; Trofa *et al.*, 2008). L'incidence des infections fongiques a fortement augmenté depuis les années 1980, notamment dans le milieu hospitalier : les candidoses sont considérées comme la quatrième cause d'infections nosocomiales (Trofa *et al.*, 2008). Avec une mortalité associée d'environ 45%, les infections à *Candida* spp. sont devenues un réel problème de santé publique (Hawser and Douglas, 1994; Trofa *et al.*, 2008). *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* représentent plus de 80% des espèces isolées dans les cas de candidoses nosocomiales. Cependant, sur une étude allant de 1997 à 2007, *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment



isolée (62.9% des infections) et elle est retrouvée responsable de plus de la moitié des candidémies (Eggimann *et al.*, 2003; Tortorano *et al.*, 2004; Weinberger *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2010) (Fig.

I-2).

L'ampleur de l'infection fongique dépend d'une part de facteurs liés à l'hôte. Ces facteurs peuvent être intrinsèques tels l'âge, le sexe ou l'affaiblissement

général de l'immunité (diabète, infection par le VIH ou cancers) (Akpan, 2002; Daniluk *et al.*, 2006) ou extrinsèques tels que des traitements médicamenteux ou chirurgicaux.

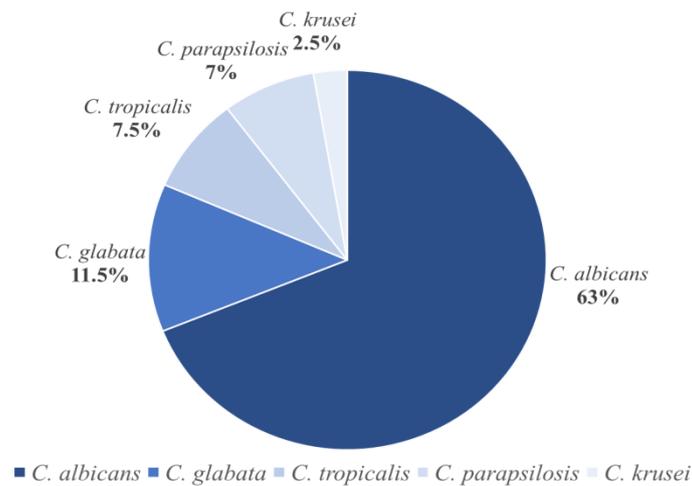


Figure I-2 : Pourcentages des espèces de *Candida* isolées dans les cas de candidoses systémiques entre 1997 et 2007 (Pfaller *et al.*, 2010).

Ainsi, une antibiothérapie à long terme peut altérer la flore microbienne commensale et favoriser le développement des candidoses. Les procédures invasives (pose de cathéters ou de sondes) offrent également aux levures une porte d'entrée dans la circulation sanguine (Akpan, 2002; Daniluk *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008). D'autre part, les levures du genre *Candida* possèdent un arsenal de facteurs de pathogénicité permettant le développement d'une infection chez l'hôte affaibli. Les facteurs les plus importants comprennent le dimorphisme (la capacité de croître sous deux formes, de levures ou de pseudo-mycéliums), la sécrétion d'enzymes lytiques (ex : protéases, phospholipases) qui facilite le passage des levures au niveau des tissus et l'adhésion cellulaire qui représente l'étape initiale de la colonisation des surfaces (vivantes ou inertes).

1.2 Adhésion microbienne : Une étape cruciale dans la formation du biofilm

1.2.1 Transport des molécules et macromolécules et des microorganismes vers les surfaces

Les surfaces entrant en contact avec un fluide peuvent être contaminées par des molécules inorganiques ou organiques, ainsi que par les microorganismes contenus dans le fluide. Cette notion de contamination est liée à une phase dite d'adsorption dans le cas des molécules et d'adhésion pour les microorganismes. L'adhésion de microorganismes sur des surfaces est un phénomène très largement rencontré dans les bio-industries, l'industrie agroalimentaire et dans le domaine biomédical où elle peut générer des problèmes économiques, écologiques et de santé

publique. Dans une suspension complexe pouvant contenir des microorganismes, l'adsorption des molécules est dans de nombreux cas quasi instantanée, même si dépendant des conditions hydrodynamiques du système. Les composés organiques et des éléments minéraux sont adsorbés sur la surface du matériau et forment un mélange complexe appelé « film conditionnant ». Ce film riche en nutriments va favoriser l'adhésion et la croissance microbienne sur la surface. Pour les éléments de plus grande taille (0.5 à 10 µm) tels les microorganismes, le transport vers la surface dépend aussi des conditions hydrodynamiques. Pour que l'adhésion puisse se produire, les microorganismes doivent arriver à proximité de la surface réceptrice. Le transport des cellules microbiennes peut être le résultat de phénomènes de convection, de diffusion ou de sédimentation. Les paramètres hydrodynamiques tels que la vitesse d'écoulement et les forces de cisaillement définissent la nature du flux (stagnant, laminaire ou turbulent) et jouent un rôle majeur sur la cinétique de biocontamination d'un matériau. Par exemple, dans un écoulement turbulent la convection joue un rôle prépondérant sur l'adhésion microbienne alors qu'elle a un rôle mineur dans des environnements stagnants au regard de la sédimentation et de la diffusion. Dans un environnement stagnant, certains microorganismes disposent de différents appendices cellulaires (curli, flagelles, pili) qui leur permettent de se déplacer par un mouvement autonome et potentiellement orienté (chimiotactisme) et d'être avantagés. Ce phénomène a été observé pour de nombreuses espèces telles *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Bacillus cereus* (Bruzaud *et al.*, 2014).

1.2.2 Différentes étapes de l'adhésion sur les surfaces et du développement du biofilm de *Candida albicans*

Les levures du genre *Candida* sont capables de se fixer aussi bien à des surfaces biotiques, telles que les cellules épithéliales (buccales ou vaginales), les kératinocytes ou les composants tissulaires (fibronectine, fibrinogène, ...), qu'à des surfaces abiotiques comme les plastiques (silicone, chlorure de polyvinyle (PVC), acrylique ...). Les surfaces lisses comme le silicone favoriseraient beaucoup moins le développement de biofilms que des surfaces plus rugueuses telles que le PVC (Hawser and Douglas, 1994; Douglas, 2003). Sur le plan général, la formation d'un biofilm est un processus complexe se déroulant schématiquement en 4 principales phases (Fig. I-3).

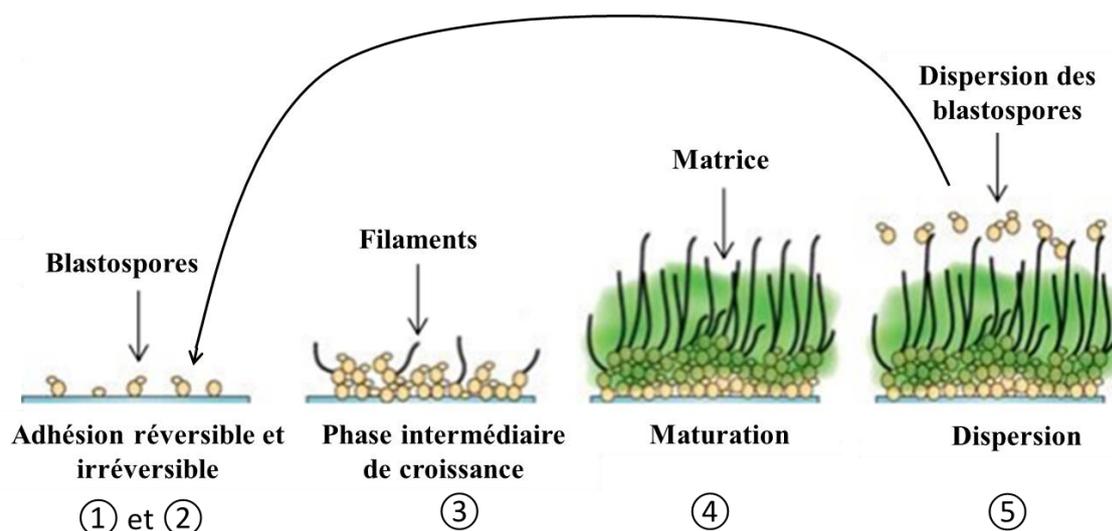


Figure I-3: Représentation schématique des principales étapes menant à la formation du biofilm de *C. albicans* sur une surface solide : ① et ② l'adhésion réversible et irréversible, ③ la phase intermédiaire de croissance, ④ la phase de maturation et ⑤ la dispersion des blastospores (adapté de (Finkel and Mitchell, 2011)).

Elle se décompose en une première phase précoce dite d'adhésion, suivie de la phase intermédiaire, puis d'une phase de maturation et enfin d'une phase de dispersion des microorganismes (Chandra *et al.*, 2001). Ce schéma concerne également *C. albicans* (Finkel and Mitchell, 2011).

➤ *La phase précoce d'adhésion*

La première étape dans la formation du biofilm est la phase précoce d'adhésion. Cette phase est extrêmement importante dans le processus de formation du biofilm. Elle est souvent citée comme la première étape du processus d'infection pour *Candida* sp. (Soll, 2008). Au début de la phase d'adhésion, la majorité des cellules sont présentes sous forme de blastospores. Les levures sous forme de blastospores arrivent à proximité de la surface, à une distance d'environ 50 nm (van Loosdrecht *et al.*, 1987) et elles vont y adhérer par l'intermédiaire de facteurs dits non spécifiques (forces électrostatiques, hydrophobicité de surface) et spécifiques (reconnaissance ligands-récepteurs de surface). La phase d'adhésion se déroule alors en deux étapes successives. Une première étape réversible et une deuxième étape irréversible. Lors de l'adhésion réversible, l'attachement initial se réalise grâce à des interactions physico-chimiques non covalentes comprenant les interactions électrostatiques (EL), les interactions électrodynamiques ou de Lifshitz-Van der Waals (LW) et des interactions de type donneur/accepteur d'électrons ou acide-base de Lewis (AB) (Fig. I-4). Cette adhésion à la surface est souvent faible et la cellule adhérente peut se dissocier de la surface pour reprendre son statut planctonique (Stoodley *et al.*, 2002; Qureshi *et al.*, 2005). La réduction progressive de la

distance entre la cellule et la surface engendre l'augmentation du nombre d'interactions et des forces de liaison entre la blastospore et la surface (Fig. I-4). Cette étape permet alors à la blastospore d'adhérer et de s'attacher fortement au substrat de manière irréversible (Baillie and Douglas, 1999; Jabra-Rizk *et al.*, 2004); ce terme signifie qu'une force importante doit être appliquée pour séparer la blastospore de la surface (ex. action mécanique). La phase précoce d'adhésion dure environ 11 heures, dans le cas de *C. albicans* et est rapidement suivie par des divisions cellulaires aboutissant à la formation de micro-colonies à la surface du support (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2005; Paulitsch *et al.*, 2009). Durant cette phase, une grande variété de facteurs environnementaux participe au développement du biofilm. Cette phase peut être influencée par la vitesse d'écoulement du milieu environnant (urine, sang, salive), le pH, la température, la présence d'agents antimicrobiens et de substances polymériques et l'hydrophobicité de la surface (Baillie, 2000; Ramage *et al.*, 2002).

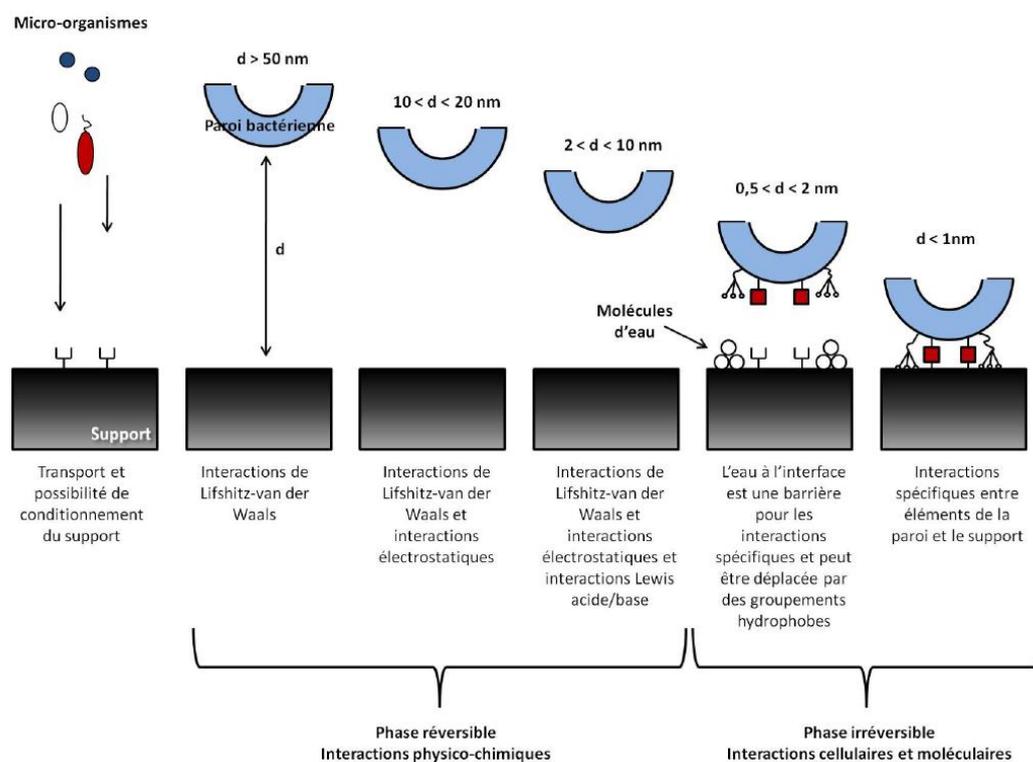


Figure I-4 : Les différents types d'interactions impliquées dans l'adhésion cellulaire en fonction de la distance de séparation entre le microorganisme et la surface (Pierre, 2010).

Par exemple, dans le domaine biomédical, le degré d'hydrophobicité et de rugosité des surfaces des cathéters contribue de façon directe à l'adhésion des microorganismes (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2012). *In vivo*, les matériaux des cathéters adsorbent rapidement les protéines de l'hôte. La surface colonisée est d'abord recouverte par un film conditionnant constitué

essentiellement de protéines spécifiques (fibrinogène et fibronectine) (Douglas, 2003; Nett *et al.*, 2011). Ce film conditionnant va également intervenir dans l'adhésion des cellules à la surface. Ainsi, *Candida* spp produit des adhésines spécifiques sur sa paroi cellulaire lui permettant d'adhérer au film de conditionnement préalablement installé sur la surface (Silva *et al.*, 2011). Par exemple, dans la littérature la liste des récepteurs de l'adhésine Als3 comprend la fibronectine humaine, la laminine, le collagène, la protéine gp96, l'EGFR, l'HER2, la N-cadhérine, etc (Gaur, 2004; Sheppard *et al.*, 2004; Phan *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Silverman *et al.*, 2010; Willaert, 2018) .

➤ *La phase intermédiaire*

Dès que l'attachement à la surface devient irréversible, la phase de croissance débute. Cette phase correspond à la multiplication par bourgeonnement et la formation d'une couche basale de micro-colonies de levures (Baillie, 2000). Les micro-colonies sont unies par les extensions des hyphes et mènent à une monocouche confluyente (Ramage *et al.*, 2009). La phase intermédiaire est caractérisée par la production de la matrice polysaccharidique extracellulaire et par le développement des formes mycéliennes (pseudo-hyphes et hyphes) à partir de blastospores bourgeonnantes (Chandra *et al.*, 2001). La fixation à la surface solide des microorganismes induit donc une cascade de changements physiologiques et la production de substances polymériques extra cellulaires (EPS), principalement composées de protéines et d'exo polysaccharides, qui vont constituer la matrice extracellulaire (MEC) protectrice. La production de ces substances augmente ainsi la capacité d'ancrage des microorganismes à la surface du matériau et l'énergie mécanique nécessaire pour rompre les liaisons mises en jeu. La phase intermédiaire se déroule entre 12 et 30 heures après l'adhésion initiale des blastospores (Chandra *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2004). Les formes filamenteuses servent de renfort à la structure et de sites d'adhésion pour de nouvelles blastospores (Ramage *et al.*, 2009).

➤ *La phase de maturation*

Durant la phase de maturation, la quantité de matériel extracellulaire augmente jusqu'au confinement de sous-populations microbiennes. La phase de maturation s'opère environ 31 à 72 heures après l'adhésion initiale des blastospores (Chandra *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2004). À ce stade, les biofilms sont organisés en une bicouche où les blastospores constituent la couche basale alors que les hyphes forment une couche supérieure ramifiée plus épaisse (Hawser and Douglas, 1994). La matrice extracellulaire s'accumule également de sorte à recouvrir entièrement les blastospores, les hyphes, et les pseudohyphes (Chandra *et al.*, 2001).

La couche basale, peu épaisse joue un rôle primordial dans la solidité de l'ancrage du biofilm à la surface (Baillie and Douglas, 1999; Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003). Sur la surface d'un élastomère de silicone, la couche basale formée par les levures de *C. albicans* peut mesurer entre 10 et 12 μm (Chandra *et al.*, 2001). La couche plus externe, composée d'hyphes et de MEC est beaucoup plus volumineuse et peut atteindre 450 μm d'épaisseur sur (Baillie and Douglas, 1999; Chandra *et al.*, 2001). Durant cette phase des canaux aqueux peuvent également se former, conduisant à une structure tridimensionnelle particulière et à la notion de macrocolonies. Ces canaux permettent de faire circuler les nutriments jusqu'aux couches profondes du biofilm et d'évacuer en parallèle les déchets métaboliques (Baillie and Douglas, 1999).

➤ *Phase finale de dissémination*

Le processus de dissémination de la levure est ensuite déclenché par le détachement de fragments du biofilm. Sous l'effet d'un certain stress, telles des carences nutritionnelles ou des modifications physico-chimiques de l'environnement, les microorganismes peuvent reprendre leur état planctonique avant de coloniser d'autres surfaces. Les microorganismes peuvent se détacher du biofilm soit par un processus passif sous l'effet de forces de cisaillement engendrées par un flux (Parsek and Singh, 2003), soit suite à la dissolution de la matrice par des enzymes hydrolytiques ou des surfactants sécrétés par les microorganismes eux-mêmes (Parsek and Singh, 2003). Le retour à l'état planctonique leur permet de pouvoir être à l'origine d'un nouveau biofilm. Cette phase joue un rôle extrêmement important dans la dissémination et la complication des infections systémiques.

1.2.3 *Régulation et perte de sensibilité*

La voie de régulation génétique de la formation des biofilms de *C. albicans* est complexe. Elle fait intervenir plusieurs groupes de gènes fonctionnels. Les principaux codent pour des facteurs de transcription (e.g. *EFG1*, *BCR1*, *TYE7*), pour des protéines kinases (e.g. *IRE1*, *CBK1*), des protéines de la paroi (e.g. *HWPI*, *ALS3*) ainsi qu'une alcool-déshydrogénase (*ADH1*) (Ganguly and Mitchell, 2011). La formation des biofilms et leur persistance mettent en jeu une communication intercellulaire appelée «Quorum Sensing» (QS) (Donlan, 2002). Les cellules communiquent par le biais de molécules diffusibles auxquelles elles vont répondre en fonction de la concentration et donc de la densité cellulaire (Hogan, 2006). Une réponse génétique et physiologique est initiée une fois qu'une concentration seuil en ces molécules est atteinte (Podbielski and Kreikemeyer, 2004). Deux molécules ont été identifiées pour *C.*

albicans : le tyrosol, qui favorise la formation d'hyphes et de biofilm, et le farnésol qui exerce l'effet inverse (Mukherjee *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2005).

Comparé à la croissance planctonique, le développement des microorganismes au sein d'un biofilm leur procure une meilleure survie. Englobés dans ce micro-environnement, ils se retrouvent protégés contre de nombreuses agressions extérieures (les variations de pH, de concentrations en nutriments, la dessiccation ou encore la prédation, ou les traitements antifongiques) (Donlan, 2002; Ramage *et al.*, 2005). Cette structure permet aussi une proximité entre microorganismes favorisant les échanges plasmidiques et les coopérations, et elle aboutit à une forte augmentation de la résistance ou plutôt à une perte de sensibilité aux traitements antimicrobiens ou encore aux défenses immunitaires de l'hôte (Ghigo, 2001; El-Azizi *et al.*, 2004). Les microorganismes sessiles peuvent être mille fois moins sensibles à un traitement antimicrobien que les cellules planctoniques (Chandra *et al.*, 2001). Les mécanismes de résistance des cellules au sein du biofilm mis en jeu sont multiples. La présence de la MEC peut modifier la diffusion des molécules antimicrobiennes, la limitation de l'accès des nutriments et de l'élimination des métabolites entraînent des changements du métabolisme et du taux de croissance, enfin via le QS l'expression de certains gènes est modifiée (exemple pompes à efflux). Cependant, il ne s'agit pas de mécanismes de résistance acquis (modification ou acquisition de nouveaux gènes) et cette perte de sensibilité est réversible lors du retour à la phase planctonique.

1.3 Influence des facteurs liés aux microorganismes, au milieu environnant et aux matériaux sur l'adhésion microbienne

1.3.1 Facteurs liés aux microorganismes

Sur une surface donnée l'adhésion microbienne dépend de l'espèce et même de la souche microbienne considérée du fait des caractéristiques métaboliques et physico-chimiques qui lui sont propres.

➤ Concentration et interactions microbiennes

Pour des paramètres physico-chimiques constants, plus la concentration microbienne du flux entrant en contact avec la surface réceptrice est grande plus le nombre de cellules adhérentes est important jusqu'à l'obtention de la couverture totale de la surface (Piette and Idziak, 1992). De plus, la présence de colonisateurs primaires peut faciliter l'adhésion d'autres

microorganismes (Beloin *et al.*, 2008). Ce phénomène appelé « co-agrégation » a été largement mis en évidence chez les microorganismes de la cavité buccale adhérant sur la dentition (Whittaker *et al.*, 1996).

➤ *Structure moléculaire de la surface microbienne et protéines impliquées*

Toute modification des caractéristiques énergétiques et biochimiques de la surface du microorganisme, y compris en fonction du milieu de culture, peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion microbienne (Grivet *et al.*, 2000; Baillif *et al.*, 2010). La plupart des bactéries ou levures sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes (Ofek and Beachey, 1980). La présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères, et de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif et de lipopolysaccharides (LPS) chez les Gram négatif contribue à l'adhésion des microorganismes aux supports (Donlan, 2002). Les fimbriae contenant une forte proportion d'acides aminés hydrophobes, cet organite conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes entre la bactérie et le matériau (Donlan, 2002). Dans les premières étapes de l'adhésion cellulaire, la mobilité du microorganisme est assurée par les flagelles qui contrecarrent les forces de répulsion électrostatique. Les LPS et plus particulièrement la partie glucidique (l'antigène O) confèrent à la bactérie des propriétés hydrophiles (Williams and Fletcher, 1996). Les EPS ou le lipopolysaccharides des bactéries à Gram - (LPS) sont donc plus impliqués dans les mécanismes d'attachement sur des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002). Chez les bactéries à Gram positif, les acides téichoïques semblent également exercer un effet sur l'adhésion cellulaire bien qu'ils confèrent une charge de surface négative. Chez les levures, la présence de phosphoprotéines au niveau pariétal est impliquée (Donlan, 2002).

Sur les muqueuses, l'adhésion des microorganismes est médiée par des structures présentes à la surface de la cellule microbienne, appelées adhésines et qui interagissent avec des composants présents à la surface de la cellule eucaryote ou présent dans la matrice extracellulaire, appelés récepteurs (An and Friedman, 1998). Ainsi, chez les levures des glycoprotéines présentes à la surface cellulaire jouent le rôle d'adhésines. Ces adhésines peuvent être définies comme des biomolécules qui initient l'adhésion de *C. albicans* aux cellules ou aux ligands de l'hôte (Calderone and Fonzi, 2001). Chez *C. albicans*, une famille de 8 gènes ALS (Agglutinin-like sequence) codant pour différentes adhésines a été identifiée (Hoyer, 2001). Parmi celles-ci, les adhésines Als1p et Als3p permettent l'adhésion de *C. albicans* aux cellules endothéliales vasculaires et aux cellules épithéliales buccales (Fu *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2004). L'adhésine Hwp1 de *C. albicans* s'est également révélée importante

lors d'infection des muqueuses buccale et œsophagienne (Sundstrom, 2002). L'adhésine Camp65p, une mannoprotéine de 65 kDa présente au niveau de la paroi cellulaire des formes levures et des formes filamenteuses de *C. albicans* semble jouer également un rôle crucial lors d'infection vaginale (De Bernardis *et al.*, 2007; Bromuro *et al.*, 1994). Gale *et al.*, 1998 ont également caractérisé une autre adhésine produite par le gène *INT1* intervenant dans l'adhésion aux cellules épithéliales et dans la morphogénèse de *C. albicans*. De plus, des appendices fibrillaires présent sur la couche externe de la paroi de *C. albicans* ont été isolés, purifiés et caractérisés (Yu *et al.*, 1994). Composés principalement de mannoprotéines, ils interviennent dans l'adhésion cellulaire en se liant à un récepteur lipidique, le glycosphingolipide lactosylcéramide qui est présent au niveau des cellules épithéliales buccales. La composition spécifique et la structure des parois bactériennes et fongiques de chaque espèce peuvent être influencées par les conditions environnementales et la phase de croissance. L'influence respective des différents éléments évoqués ci-dessus varie donc continuellement.

➤ *Caractère hydrophobe et charge de la surface microbienne*

L'hydrophobicité de la surface microbienne varie suivant les espèces et, au sein d'une même espèce, selon le milieu environnant, l'âge du microorganisme, via la structure et la composition de la paroi cellulaire (Dankert, 1986; Krekeler *et al.*, 1989; Schlöricke *et al.*, 1997). Généralement, les bactéries hydrophobes préfèrent des surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles des surfaces hydrophiles (Palmer *et al.*, 2007 ; Hogt *et al.*, 1983; Satou *et al.*, 1988; Vacheethasane *et al.*, 1998). Cependant, les bactéries hydrophobes paraissent avoir une meilleure capacité d'adhésion en comparaison avec des bactéries hydrophiles dans un milieu aqueux soumis à un flux de faible intensité (Van Loosdrecht *et al.*, 1987). Les études menées pour diminuer artificiellement l'hydrophobicité des bactéries par de la pepsine ou par des subcultures répétées aboutissent à une décroissance des propriétés adhésives (Westergren and Olsson, 1983; Hogt *et al.*, 1983; Satou *et al.*, 1988). L'hydrophobicité de la surface cellulaire de *C. albicans* constitue un élément déterminant pour son l'adhésion à des matériaux de type plastique intervenant dans la composition de nombreux accessoires du domaine biomédical. Cependant, *in vitro*, aucune corrélation entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire des levures et l'adhésion à des cellules épithéliales n'a pu être observée (Hazen, 1989). Ce type d'interaction ne semble donc pas être prédominant dans le processus d'adhésion aux épithéliums.

La plupart des éléments biologiques acquièrent une charge électrique de surface lorsqu'ils sont mis en suspension dans un milieu aqueux. Cette charge provient de l'ionisation de leurs

groupements chimiques de surface. Elle est définie par la mesure du point isoélectrique (pI), du potentiel électrocinétique ou de la mobilité électrophorétique. Les microorganismes en solution aqueuse sont en général presque toujours chargés négativement (Jucker *et al.*, 1996; Gottenbos *et al.*, 2001; Katsikogianni and Missirlis, 2004). Une cellule dont la charge de surface est élevée est presque toujours hydrophile (Hogt *et al.*, 1985). Cette charge varie en fonction de l'espèce et est influencée par le milieu de culture (pH, force ionique), par l'âge, ainsi que la structure de la surface cellulaire (Dankert, 1986). La contribution relative de la charge cellulaire par rapport à l'adhésion n'est cependant toujours pas clairement comprise (Katsikogianni and Missirlis, 2004). Le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements chimiques dissociés (carboxyles, phosphates, amines, etc.) présents en surface, intervient dans l'intensité des forces d'interaction électrostatique. Par conséquent, l'adhésion des cellules est favorisée lorsque leur charge de surface est nulle, c'est-à-dire lorsque le pH du milieu est proche du pI du microorganisme (Rönner *et al.*, 1990). Le pI de la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif est compris entre 2 et 4 (Harden and Harris, 1953). Il en est de même pour les levures (Mercier-Bonin *et al.*, 2004). Au pH physiologique (~ 7.0), les microorganismes présentent donc une charge de surface négative (An and Friedman, 1998; Palmer *et al.*, 2007). De ce fait, des phénomènes de répulsion électrostatique avec les supports de charge négative ont lieu à ce pH, comme par exemple avec le verre (Gu and Li, 2000), le Teflon (Jucker *et al.*, 1996) ou l'acier inoxydable (Kallay *et al.*, 1994); (Brugnoni *et al.*, 2007). La concentration en sels dans le milieu influence également la charge surfacique des microorganismes (Poortinga *et al.*, 2002). Les phénomènes de répulsion électrostatique sont favorisés dans les solutions de faible force ionique (Husmark and Rönner, 1990). Ils sont moins importants dans les milieux de force ionique élevée. Ainsi, Vernehet et Bellon-Fontaine ont démontré l'absence d'interactions électrostatiques entre des levures *S. cerevisiae* et une surface de verre dans une solution de KNO_3 à 0.06 M (Vernhet et Bellon-Fontaine, 1995).

➤ *Phase de croissance et état physiologique*

La composition de la paroi cellulaire et les propriétés physico-chimiques de la surface évoluent en fonction de l'étape de croissance et de l'état physiologique des microorganismes (Palmer *et al.*, 2007). Ainsi, Sharon *et al.* (2005) ont évalué l'influence de la phase de croissance d'*E. coli* K12 (phase exponentielle / phase stationnaire) sur l'adhésion à une surface de quartz (Walker *et al.*, 2005). En phase stationnaire de croissance un attachement plus important des cellules a été observé. Cette observation a été attribuée à une forte hétérogénéité de la charge de surface permettant une diminution globale des forces de répulsion électrostatique avec le

support, couplée à une implication de certaines macromolécules (Walker *et al.*, 2005). Chen et Strevett (2001) ont également étudié l'adhésion de différentes bactéries (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*) à des milieux poreux en fonction de leur phase de croissance (phase exponentielle, stationnaire et de déclin) (Chen and Strevett, 2001). Les résultats ont montré que les bactéries étaient les plus adhésives dans la phase stationnaire de croissance. Concernant les levures, Robert *et al.* (1980) ont montré que les blastospores de *C. albicans* récupérées en phase stationnaire étaient plus adhérentes aux cellules épithéliales que les blastospores récupérées en phase logarithmique (King *et al.*, 1980).

➤ *Adaptation phénotypique des microorganismes adhérents*

L'adhésion à une surface réceptrice engendre chez les microorganismes une perception différente de leur environnement avec l'activation ou la sous-expression de gènes spécifiques selon les nouveaux besoins de la cellule (Ghigo, 2003). Par exemple chez *P. aeruginosa*, les gènes codants pour les flagelles sont inhibés, du fait de l'état sessile du microorganisme (Kuchma et O'Toole, 2000). Chez *E. coli*, durant le développement du biofilm l'expression des gènes impliqués dans la communication (QS), dans la production d'EPS, de protéines pariétales ou dans certaines voies métaboliques augmente (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). Concernant *C. albicans*, des niveaux d'expression différents ont été retrouvés pour les gènes *ALS1* et *ALS3* (codant des glycoprotéines de la surface cellulaire) durant les différentes phases de formation du biofilm (Nailis *et al.*, 2009). Les microorganismes sessiles développent donc des caractéristiques phénotypiques très différentes de celles des cellules planctoniques.

1.3.2 *Facteurs liés à l'environnement*

Les facteurs environnementaux tels que la température, l'existence de flux, la qualité et la quantité des substances nutritives environnantes affectent l'adhésion microbienne et la formation du biofilm. Ainsi, certaines souches bactériennes incapables de s'organiser en biofilm *in vivo* peuvent présenter cette faculté *in vitro* dans des conditions environnementales propices (Baillif *et al.*, 2010). Inversement, une souche bactérienne isolée à partir d'un biofilm développé à la surface d'un dispositif biomédical peut, *in vitro*, perdre cette propriété du fait de conditions environnementales trop éloignées des conditions physiologiques (Cramton and Götz, 2004; Baillif *et al.*, 2006).

➤ *Forces hydrodynamiques*

Les forces hydrodynamiques sont des facteurs environnementaux les plus susceptibles d'affecter l'adhésion bactérienne et le développement du biofilm bactérien (Baillif *et al.*, 2010; Bellifa, 2014). La vitesse du fluide influence en premier lieu l'épaisseur de la couche limite au niveau de l'interface matériau/liquide (Donlan, 2002). Avec un régime laminaire ou faiblement turbulent, la couche limite d'interaction est épaisse et l'adhésion microbienne dépend des capacités des cellules à pénétrer cette couche. Le mouvement brownien, la gravité ou des mouvements de convection peuvent favoriser cette adhésion initiale (Palmer *et al.*, 2007). En régime turbulent les tourbillons peuvent faciliter le contact entre les cellules et la surface (Palmer *et al.*, 2007). Cependant l'épaisseur de la couche limite hydrodynamique étant diminuée, le temps d'interaction entre la cellule et le matériau est réduit ce qui empêche l'établissement d'un attachement irréversible. De plus la répartition des cellules sur le support est modulée par le régime et l'intensité du flux. Avec un régime laminaire, les microorganismes auront tendance à s'organiser en agrégats amorphes alors qu'en cas d'écoulement turbulent, elles auront plutôt tendance à adopter une disposition en fins serpentins placés dans le sens du courant (Baillif *et al.*, 2010). L'existence d'un courant à la surface du support lors de la phase d'adhésion initiale influencera donc la robustesse de l'attachement microbien au support (Baillif *et al.*, 2010).

➤ *Température*

La température du milieu environnant influe sur la colonisation microbienne. Elle est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des cellules (température optimale de croissance), mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes (Dumas, 2007). Par exemple, l'adhésion d'*E. coli* à la surface du polypropylène est plus importante à 30°C qu'à 12°C. (Pompermayer and Gaylarde, 2000). Concernant *C. albicans*, les résultats d'une étude sur des souris ont révélé que levures développées à la température ambiante (22-25°C) étaient plus virulentes que les cellules cultivées à 37 °C (Antley and Hazen, 1988).

➤ *Influence du pH du milieu environnant*

Le pH du milieu environnant influence la croissance cellulaire, modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence

une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives qui interviennent dans l'adhésion (Boutaleb, 2007; Hamadi *et al.*, 2011).

➤ *Composition du milieu et force ionique*

La composition du milieu nutritif au niveau qualitatif et quantitatif module l'adhésion microbienne. La concentration en nutriments joue également un rôle majeur. Un milieu riche en éléments nutritifs (carbone, azote...) desquels dépend le métabolisme microbien (exemple la synthèse des composés pariétaux) pourra alors influencer les propriétés de la surface cellulaire et donc l'adhésion initiale des cellules (Strevett and Chen, 2003; Bellifa, 2014). La force ionique du milieu peut également influencer l'adhésion microbienne par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques mises en place entre le microorganisme et le support. En effet, la charge de surface du matériau et des cellules est influencée par la concentration en sels dans le milieu. Ainsi l'augmentation de la force ionique de 10 à 100 mM induit une augmentation de l'adhésion de *P. fluorescens*. (Piette and Idziak, 1992). Avec la levure *S. cerevisiae* le même phénomène a été observé sur un support de verre en augmentant la force ionique de 150 mM à 1.5 M. Cette augmentation de l'adhésion peut s'expliquer par la diminution des forces de répulsion électrostatique entre le microorganisme et la surface, entraînant la réduction de l'épaisseur de la double couche ionique. La nature des sels peut également influencer l'adhésion en entraînant une neutralisation des charges négatives de la surface cellulaire. (McEldowney and Fletcher, 1988; Fletcher, 1988). Ainsi, la présence d'ions calcium ou magnésium semble faciliter l'adhésion réversible des cellules à un support.

1.3.3 *Facteurs liés aux matériaux*

Chaque surface mise en contact avec un fluide contenant des microorganismes est un support potentiel pour la formation d'un biofilm (Rochemonteix, 2009).

➤ *Géométrie et rugosité de la surface du support*

L'adhésion microbienne peut être influencée positivement ou négativement selon la topographie de la surface (géométrie, rugosité, largeur et profondeur des micro-crevasses, présence de rayure) et la taille du microorganisme. Les microorganismes colonisent préférentiellement les supports poreux et se regroupent en général au niveau des aspérités, des ruptures de courbure. L'accumulation des biofilms à la surface des supports se réalise de fait dans les zones où la circulation des fluides environnants est freinée par les frottements sur les parois (Campanac *et al.*, 2002). Ainsi la présence de fissures et de micro-crevasses augmente

l'aire de contact et peut favoriser l'adhésion microbienne en protégeant les microorganismes des phénomènes de cisaillement hydrodynamique. Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante. Au contraire les surfaces polies diminuent l'adhésion initiale des microorganismes (Arnold and Bailey, 2000). Néanmoins, les souches bactériennes colonisent aussi des surfaces lisses (Characklis and Cooksey, 1983; Characklis *et al.*, 1990; Donlan and Costerton, 2002; Donlan, 2002). Dans l'industrie agroalimentaire, les caractéristiques physiques des surfaces solides sont très importantes parce qu'ils influencent l'attachement cellulaire initial et la formation du biofilm par la suite. Characklis, McFeters et Marshall (1990) ont observé que l'adhésion microbienne est corrélée à la rugosité de la surface (Characklis *et al.*, 1990). Des études complémentaires de Jones, Adams, Zhdan et Chamberlain en 1999 ont également démontré que les défauts de surface pouvaient être corrélés à une augmentation significative de l'adhésion microbienne (Jones *et al.*, 1999).

➤ *Propriétés physico-chimiques de la surface*

Les propriétés physico-chimiques (Van Haecht *et al.*, 1985) de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et apolaires comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger *et al.*, 1993).

➤ *Nature chimique et charge de la surface*

Bien que de la contamination microbienne soit retrouvée sur tout type de matériaux, leurs propriétés de surface (composition chimique, propriétés physico-chimiques, topographie) jouent un rôle non négligeable sur les interactions avec les microorganismes. En effet, la charge de surface des matériaux contrôlée par la force ionique et le pH du milieu contribue à l'adhésion cellulaire.

➤ *Hydrophobicité de surface*

L'adhésion des cellules aux surfaces solides dépend de l'hydrophobie du matériau, en regard de celle des microorganismes, et des caractéristiques du milieu (Pringle and Fletcher, 1983; An and Friedman, 1998; Bos *et al.*, 1999; Bruinsma *et al.*, 2001). La plupart des études, réalisées dans des domaines d'applications divers, ont montré que les microorganismes adhèrent plus difficilement aux matériaux hydrophiles (ex. : verre, métaux), présentant une forte

affinité pour l'eau et les solvants polaires, qu'aux matériaux hydrophobes (ex. : polyéthylène, polystyrène, Téflon). Dans le cas des surfaces hydrophiles, des liaisons hydrogène s'établissent entre les molécules d'eau du milieu et les groupements fonctionnels polaires ou chargés du support solide. Ceci provoque un phénomène de répulsion hydrophile avec la surface microbienne, si celle-ci est hydrophile, du fait de l'existence d'une couche d'eau liée aux surfaces et organisée en réseau. Au contraire, un support hydrophobe est inerte vis-à-vis des molécules d'eau, qui ont tendance à s'en éloigner. Dans le cas où ces molécules sont confinées entre deux surfaces hydrophobes (support et microorganisme), leur mouvement moyen en direction de la solution aqueuse favorise le rapprochement des surfaces, ce qui se traduit par un phénomène d'attraction hydrophobe.

➤ *Présence d'un film conditionnant sur la surface*

Dans la plupart des environnements, une surface solide exposée à un milieu liquide est systématiquement recouverte d'une couche de macromolécules plus ou moins homogène qui en modifie les propriétés physico-chimiques (charge et énergie libre) et influence l'adhésion microbienne (Van Haecht *et al.*, 1985; Oss and Naim, 1996). La présence de polymères sur un support modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface et a une influence directe sur l'attachement de microorganismes à cette dernière. Le film conditionnant ou film primaire se crée rapidement en quelques secondes, mais peut évoluer sur des durées beaucoup plus longues. Tous les matériaux hydrophobes ou hydrophiles sont sujets à ce phénomène. Le conditionnement d'une surface par des fluides physiologiques (par exemple : le sang, l'urine, la salive...), en modifiant l'interface influence l'attachement des microorganismes et par la suite peut favoriser la formation et le développement du biofilm microbien (Nobbs *et al.*, 2009). Si les interactions entre le film conditionnant et les microorganismes sont suffisamment fortes c'est au film conditionnant et non à la surface que le microorganisme adhèrera initialement.

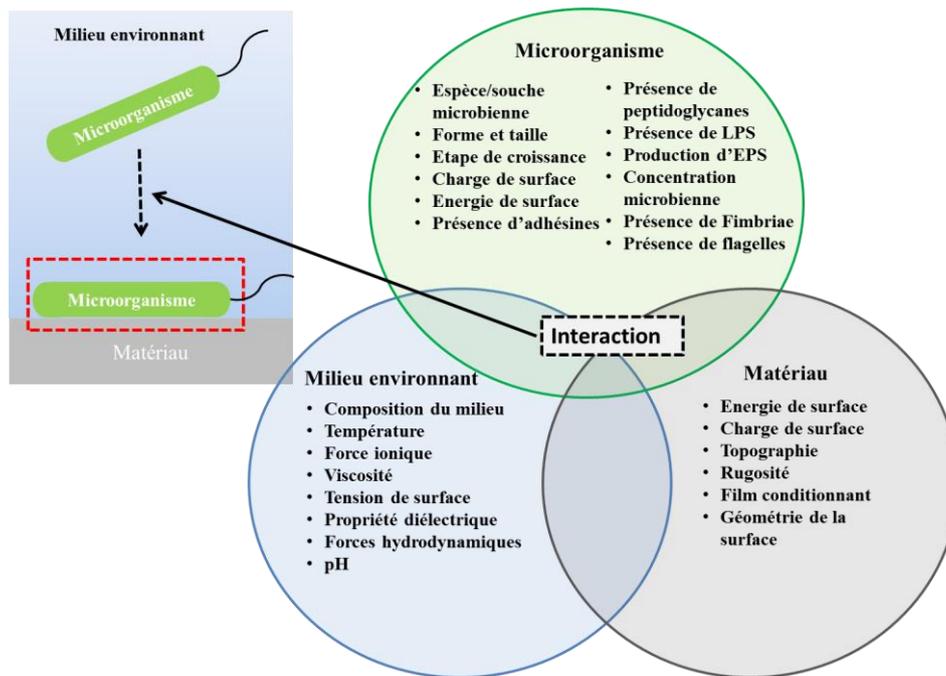


Figure I-5 : Représentation schématisée des facteurs influençant l'adhésion microbienne initiale à l'interface solide-liquide. Le résultat du processus d'adhésion est régi par l'interaction des propriétés du microorganisme, de la surface solide et du milieu liquide environnant adapté de (Cheng *et al.*, 2019).

L'ensemble de tous les facteurs influençant l'adhésion microbienne est résumé dans la Fig. I-5. Que les surfaces impliquées soient biologiques ou inertes, l'adhésion microbienne est un mécanisme multifactoriel qui évolue dans le temps en mettant en jeu de nombreux paramètres. Ces paramètres sont inhérents à la surface du matériau, aux microorganismes et au milieu environnant. La maîtrise de l'ensemble des paramètres influençant l'étape d'adhésion initiale est un verrou scientifique et technologique pour les industriels et également les professionnels du milieu médical, où la colonisation microbienne des surfaces est à l'origine d'impacts particulièrement négatifs.

1.4 Implication de l'adsorption des protéines dans l'adhésion microbienne et la formation du biofilm

Les protéines sont naturellement présentes sur les surfaces dès lors que celles-ci entrent en contact avec des fluides biologiques environnants (Latour, 2008). L'adsorption des protéines est donc un facteur important à prendre en compte lors de l'étude de l'adhésion microbienne. Elle peut, en entraînant la modification des propriétés physico-chimiques de la surface, favoriser ou inhiber l'adhésion microbienne, modifier la diffusion des microorganismes

(Williams, 2008) ou encore modifier la biodégradabilité du matériau. Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés. Il existe 20 acides aminés (AA) naturels ayant des caractères structuraux communs. La composition chimique (nombre et pourcentage d'AA) et l'ordre d'enchaînement des AA (formation des liaisons peptidiques) constituent la structure primaire d'une protéine. Une protéine est donc un groupement d'acides aminés tenus ensemble par des liaisons peptidiques (liaisons covalentes entre un atome de carbone et un atome d'azote de deux acides aminés). La structure secondaire résulte de la formation de liaisons hydrogène, ioniques, ou de ponts disulfures, qui déterminent localement la forme de la protéine. Deux types de structures secondaires prédominent : les hélices alpha (enroulement hélicoïdal) et les feuillets bêta (enroulement en feuillets plissés). Elles sont reliées entre elles par des structures plus désordonnées ou des « turns ». On parle de protéine lorsque plus de 100 acides aminés sont liés au sein d'une chaîne. Les radicaux des acides aminés (parties qui varient d'un acide aminé à l'autre) ont des propriétés chimiques différentes. Certains sont hydrophobes, d'autres hydrophiles ; certains s'ionisent négativement et d'autres positivement. Certains radicaux peuvent se repousser ou s'attirer en formant des liaisons chimiques. La chaîne d'acides aminés aura donc tendance à se replier sur elle-même pour adopter une structure tridimensionnelle précise. La forme tridimensionnelle d'une protéine est critique pour sa (ses) fonction(s). Une protéine se compose d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés (chaînes polypeptidiques) qui se replie dans des conformations impliquant des liaisons chimiques. Les liaisons reliant les acides aminés dans une même chaîne sont des liaisons fortes et covalentes, alors que la plupart des liaisons qui maintiennent la forme tridimensionnelle des protéines sont typiquement des liaisons de faible énergie qui peuvent être cassées facilement par des composés chimiques, par la chaleur... Ainsi, l'organisation spatiale dans l'espace tridimensionnel permet d'obtenir la forme finale de la protéine, dite structure tertiaire, dont la stabilité est assurée par des interactions covalentes (ponts disulfures), des interactions électrostatiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogène), des interactions de van der Waals ou encore des interactions avec le solvant et l'environnement (ions, lipides...). Les protéines les plus complexes ont un quatrième niveau d'organisation de leur structure appelé structure quaternaire. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine. Les protéines peuvent adopter différentes structures tertiaires lorsqu'elles sont en interaction avec d'autres molécules ou adsorbées sur une surface. En effet, la surface d'une protéine présente des groupements hydrophobes et hydrophiles, chargés positivement et/ou négativement, des régions polaires et apolaires. Différentes interactions auront donc lieu entre la protéine et la surface suivant leurs caractéristiques physico-chimiques respectives. Ceci peut

amener à une dénaturation de la protéine ou à un changement de sa conformation au contact de la surface (Soderquist and Walton, 1980; Larsericsdotter *et al.*, 2005).

1.4.1 Interactions des protéines avec des surfaces solides

L'adsorption des protéines sur une surface solide est un problème important dans divers domaines: médical, agro-alimentaire ou encore milieu marin et réseaux de distribution d'eau potable (Sakiyama *et al.*, 2004). Les protéines adsorbées à la surface peuvent favoriser l'adhésion de microorganismes (Jenney and Anderson, 2000) et par conséquent, détériorer l'état sanitaire de la surface. Les molécules les plus grandes disposent de beaucoup plus de sites de contact pour interagir avec la surface. Généralement, les molécules s'adsorbent plus facilement quand elles sont près de leur point isoélectrique. Les molécules qui se déplient rapidement peuvent former des contacts avec la surface plus rapidement (Lartundo-Rojas, 2007). Les propriétés des protéines et de la surface avec laquelle elles interagissent influencent le comportement interfacial des protéines. L'adsorption dépend également de la disponibilité des molécules. Des molécules peuvent être amenées à la surface par un ou plusieurs des quatre mécanismes principaux de transport : (1) diffusion, (2) convection naturelle, (3) convection forcée et (4) transport couplé. Des variables comme la concentration et la taille des protéines sont importantes pour déterminer leur accès à la surface (Ratner *et al.*, 2004).

Dans le domaine biomédical, la surface des dispositifs est souvent en contact avec des fluides biologiques contenant des protéines. En effet, au sein de notre organisme, le taux de protéines dans le sang (appelé protéinémie) est compris entre 60 et 80 mg.mL⁻¹ composé par les albumines (liées à la régulation de la pression dans les vaisseaux sanguins), les immunoglobulines du système immunitaire et d'autres protéines impliquées dans la coagulation du sang ou la réponse immunitaire. Les infections microbiennes chez l'homme (notamment via les dispositifs médicaux) se produisent donc en présence de protéines. Quelques minutes après l'insertion d'un implant par exemple, les protéines adsorbent à sa surface et une couche protéique est formée. L'accumulation de protéines sur la surface peut donc conduire à la formation d'un film « conditionnant » qui peut être sub-, mono- ou multicouche. Ce film peut être composé d'albumine, de fractions du complément, d'immunoglobulines, de fibrine, de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de vitronectine (Vacheethasane and Marchant, 2000; Abu-Lail and Camesano, 2003; Cogan and Keener, 2004; Sivakumar *et al.*, 2010). La composition protéique du film peut améliorer « l'ancrage » des microorganismes sur

la surface grâce aux interactions ligands-récepteurs (Alt *et al.*, 1999) ou acide/base de Lewis entre elles et les microorganismes, ou au contraire limiter l'adhésion cellulaire par des interactions répulsives, le plus souvent électrostatiques (Pringle and Fletcher, 1986; Herrmann *et al.*, 1988; Ostuni *et al.*, 2001; Katsikogianni and Missirlis, 2004; Tang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009). Il devient important en cas d'étude de l'adhésion microbienne sur des biomatériaux de déterminer si une adsorption protéique a lieu, les protéines adsorbées et le taux de recouvrement du biomatériau par la protéine d'intérêt (Dahiya and Speck, 1968).

Dans l'industrie agroalimentaire, les caractéristiques physiques des surfaces solides sont très importantes parce qu'ils influencent l'attachement cellulaire initial et la formation du biofilm par la suite. Characklis, McFeters et Marshall (1990) ont observé que l'adhésion microbienne est corrélée à la rugosité de la surface (Characklis *et al.*, 1990). Des études complémentaires de Jones, Adams, Zhdan et Chamberlain en 1999 ont également démontré que les défauts de surface pouvaient être corrélés à une augmentation significative de l'adhésion microbienne (Jones *et al.*, 1999). Dans le secteur agro-alimentaire et notamment les systèmes de transformation des aliments, les surfaces des équipements peuvent être recouvertes d'un film composé de nombreuses molécules complexes comme des protéines (provenance : lait, porc, bœuf) ou encore contenir des molécules utilisées pour le nettoyage ou des désinfectants. Par exemple, la mise en contact de l'acier inoxydable et du téflon avec les aliments peut attirer des protéines à la surface des substrats et provoquer la formation de substrats conditionnés (Speers et Gilmour, 1985; McGuire et Swartzel, 1989). Dans l'industrie laitière, le film conditionnant formé est fonction de la concentration de lait. Ainsi, Hood et Zottola ont montré que le substrat conditionné par le lait dilué possède une meilleure adhérence pour la fixation d'agents pathogènes comparée à celle du lait entier (Hood et Zottola, 1997). Helke *et al.* (1993) ont également observé que les protéines contenues dans le lait telles que la caséine et la β -lactoglobuline et adsorbées sur la surface diminuent considérablement l'adhésion des bactéries *Salmonella thyphimurium* et *Listeria monocytogenes* sur l'acier par rapport aux surfaces de contrôle non conditionnées avec des protéines. Le type de protéines conditionnées sur la surface joue également un rôle important dans l'adhésion microbienne. En effet, Fletcher (1976) a montré que certaines protéines telles que l'albumine, la gélatine, le fibrinogène et la pepsine inhibent la fixation d'un *Pseudomonas* marin au polystyrène (Fletcher, 1976). De même, Meadows (1971) a également montré cet effet inhibiteur de l'albumine alors que la caséine et la gélatine favorisent le processus de fixation microbien (Meadows, 1971). Cependant, en présence de protéines de lactosérum, Speers et Gilmour (1985) ont observé une augmentation de la fixation de plusieurs microorganismes associés au lait sur des surfaces en acier inoxydable,

en caoutchouc et en verre. Le pH et la composition ionique du fluide sont également des facteurs importants à prendre en compte. En fonction des caractéristiques énergétiques de la surface solide, l'adsorption des macromolécules peut être augmentée, réduite ou orientée (Leclercq-Perlat and Lalande, 1994). L'adsorption maximale des protéines sur une surface se produit préférentiellement au point isoélectrique de la molécule (Hegg *et al.*, 1985; Luey *et al.*, 1991). L'initiation de la fixation microbienne dépendra alors des propriétés de surface du substrat ainsi conditionné (Bryers, 1987).

1.4.2 Les protéines utilisées : La sérum albumine bovine (SAB), la fibronectine plasmatique humaine (Fn) et la protéine fluorescente rouge DsRed

Pour pouvoir initier une étude sur l'adsorption protéique sur les différents nanocomposites élaborés au cours de cette thèse et également connaître l'influence des protéines adsorbées sur l'adhésion microbienne, nous avons sélectionné deux modèles de protéines différentes, connues pour leur rôle respectivement négatif et positif sur l'adhésion microbienne : la Sérum Albumine Bovine (SAB) et la Fibronectine plasmatique humaine (Fn). Nous avons également sélectionné une troisième protéine, la DsRed (*Discosoma Red fluorescent protein*) comme protéine modèle fluorescente afin d'effectuer des études de spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS).

➤ La sérum albumine bovine (SAB) :

Afin de connaître les effets résultant de l'adsorption d'une protéine sur la silice thermique (SiO_2^{th}) et les différents nanocomposites, la protéine modèle de SAB a été choisie. Sa composition en acides aminés a été publiée pour la première fois par J.R. Brown en 1975, puis en 1990 Hirayama *et al.* ont fait une révision de la structure primaire de la SAB (Hirayama *et al.*, 1990). La SAB est une protéine globulaire avec un poids moléculaire de 66.43 kDa (66430 g/mol). Elle présente une structure primaire en forme de cœur (Fig. I-6a). Sa structure secondaire contient entre 50 et 68% d'hélices α et entre 16 et 18% de feuillets β . La variation du pH conduit à une transition réversible de la forme isomérique de la protéine en différentes formes (Fig. I-6b). La structure tertiaire de la SAB n'est toujours pas connue. Le point isoélectrique de la SAB est compris entre 4.7 et 4.9 en solution aqueuse à 25°C. Une variation du pH de la solution engendre la modification de la charge globale de la protéine et conduit à une isomérisation conformationnelle réversible (Bos *et al.*, 1989). La transition de la forme N

à la forme F provoque le déploiement de la molécule (Geisow and Beaven, 1977; Khan, 1986) (Fig. I-6b). Cette transition s'accompagne d'une augmentation importante de la viscosité intrinsèque, d'une forte diminution de la solubilité et d'une perte significative du contenu hélicoïdal de la protéine (Putnam, 1975). Une autre transition, de la forme F à la forme E engendre une expansion plus importante de la molécule et également une augmentation importante de la viscosité intrinsèque (Harrington *et al.*, 1956). La forme E de la SAB ressemble morphologiquement à une séquence de boules et de cordons. La transition de la forme N à la forme B a pour conséquence une diminution du pourcentage d'hélices α accompagnée d'une augmentation du pourcentage de feuillets β et de structures désordonnées.

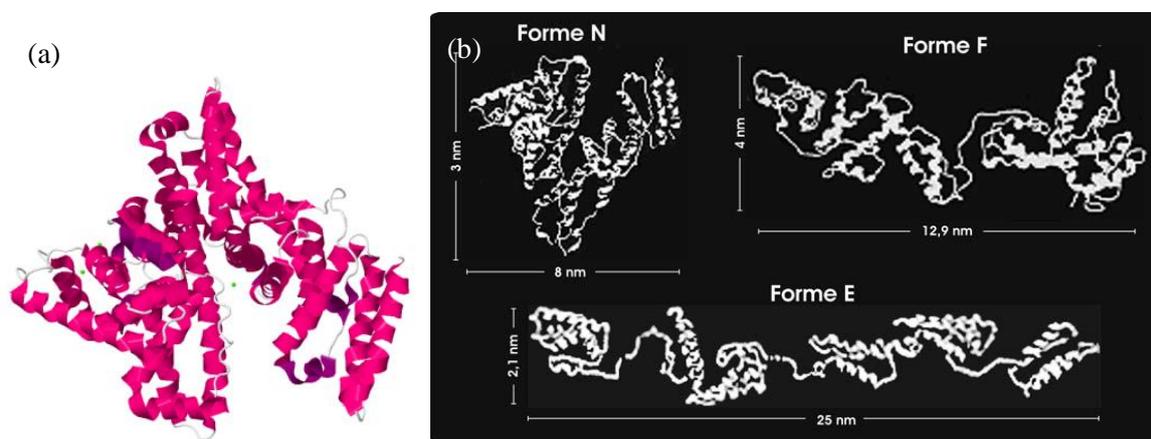


Figure I-6 : (a) Structure secondaire de la SAB avec les d'hélices α colorées en violet et les feuillets β en rose et (b) la SAB sous sa forme N, F et E (Lartundo-Rojas, 2007).

➤ *La fibronectine plasmatique humaine (Fn) :*

La molécule de Fibronectine (*Fibra* (fibre) et *nectere* (relier, connecter)) est un hétérodimère composé de deux sous-unités dont le poids moléculaire est compris entre 220 et 250 kDa. Le poids moléculaire des deux sous-unités associées est alors compris entre 450 et 500 kDa. Elles sont reliées par deux ponts disulfure situés à l'extrémité C-terminale des chaînes. La structure primaire d'une sous-unité de Fn est une chaîne polypeptidique comportant entre 2145 et 2445 acides aminés. La structure secondaire d'un brin de Fn est présentée dans la figure I-7. Elle est composée de séries d'unités protéiques homologues répétitives, ou homologies, de 3 types différents (I, II, III), selon leur longueur en acides aminés et la stabilisation ou non des séquences par des ponts disulfure. Elle possède un rayon hydrodynamique d'environ 8.7 nm. Dans sa conformation dépliée, la Fn possède une longueur d'environ 140 nm. Il existe au moins

deux types de fibronectine : la première se trouve sous forme soluble dans le plasma sanguin (environ 200-300 $\mu\text{g/mL}$) et certains liquides biologiques ; la seconde est insoluble et est présente dans les tissus où elle est assemblée en matrice fibrillaire. Elle est impliquée dans de nombreux processus comme l'opsonisation, la thrombose et la cicatrisation. La principale propriété de la Fn est de moduler les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules. Molécule d'adhérence, elle participe, via la formation du complexe Fn/intégrines, aux processus de communication intercellulaire en stimulant des voies de transmission du signal classiques ou originales, et participe donc à la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la motilité cellulaires. La Fn humaine a une structure secondaire de type β . Elle est stabilisée par les nombreux ponts disulfure intramoléculaires des homologues de types I et II. Plus de 90 % de cette structure sont conservés à des températures allant de 20 à 70°C, et à des pH de l'ordre de 3. Quant à la structure tertiaire, elle peut varier d'une forme compacte en une forme étirée en fonction de la composition du solvant. La structure compacte est favorisée par des conditions voisines des conditions physiologiques et le passage à la structure ouverte se fait lorsqu'on augmente la force ionique, le pH ou la concentration en glycérol. Cette transformation réversible se fait sans changement significatif de la structure secondaire.

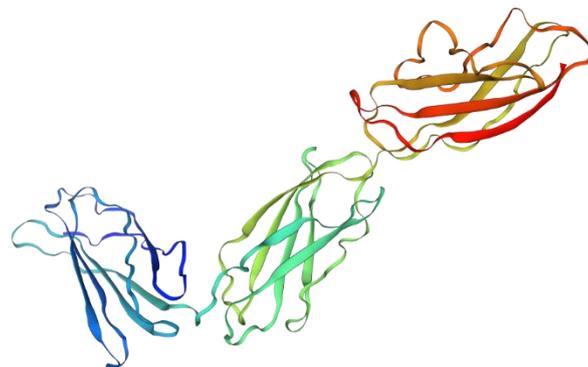


Figure I-7 : Représentation schématique de la structure de la Fn. La structure protéique présentée ici est composée de 2240 acides aminés (numéro d'accèsion B7ZLE5 sur unitProt.org <https://www.uniprot.org/uniprot/B7ZLE5>).

➤ *La protéine Discosoma Rouge Fluorescente (DsRed)*

Les protéines fluorescentes ont été choisies par rapport à la disponibilité des lasers au laboratoire. En effet, le microscope « spectro-imageur XploRA » possède un laser avec une longueur d'onde d'excitation de 532 nm. La DsRed (Fig. I-8) est une protéine tétramérique (120 kDa, 4 x 225 aa) issue d'un corail (*Discosoma*) ayant la propriété intrinsèque d'émettre une

fluorescence de couleur rouge. La DsRed possédant une longueur d'onde d'excitation maximale de 558 nm (lumière verte), la plus proche de celle du laser, cette protéine a donc été sélectionnée. De plus, son spectre d'émission de fluorescence présente une "queue" haute en énergie assez large (longueur d'onde d'émission maximale à 583 nm). La DsRed forme un tétramère très stable et chaque monomère a une structure comparable (22%) à celle de la GFP (green fluorescent protein) (Verkhusha and Lukyanov, 2004). Le chromophore de la DsRed est formé des acides aminés 66-68 (Gln-Tyr-Gly). La maturation du chromophore de la DsRed s'effectue en plusieurs étapes (Fig. I-8b). Il s'agit d'un mécanisme de repliement et de réarrangement intramoléculaire comprenant 5 étapes citées ci-dessous (Fig. I-8b) : (1) réarrangement du chromophore par torsion, (2) cyclisation, (3) déshydratation, (4) oxydation et (5) déshydrogénation au niveau du Gln (Glutamine). C'est à la fin de ce processus que la protéine devient fluorescente. La DsRed est également stable à un pH de 5 à 12 (Vrzheshch *et al.*, 2000). Le chromophore de la DsRed est présenté sur la Figure 8c.

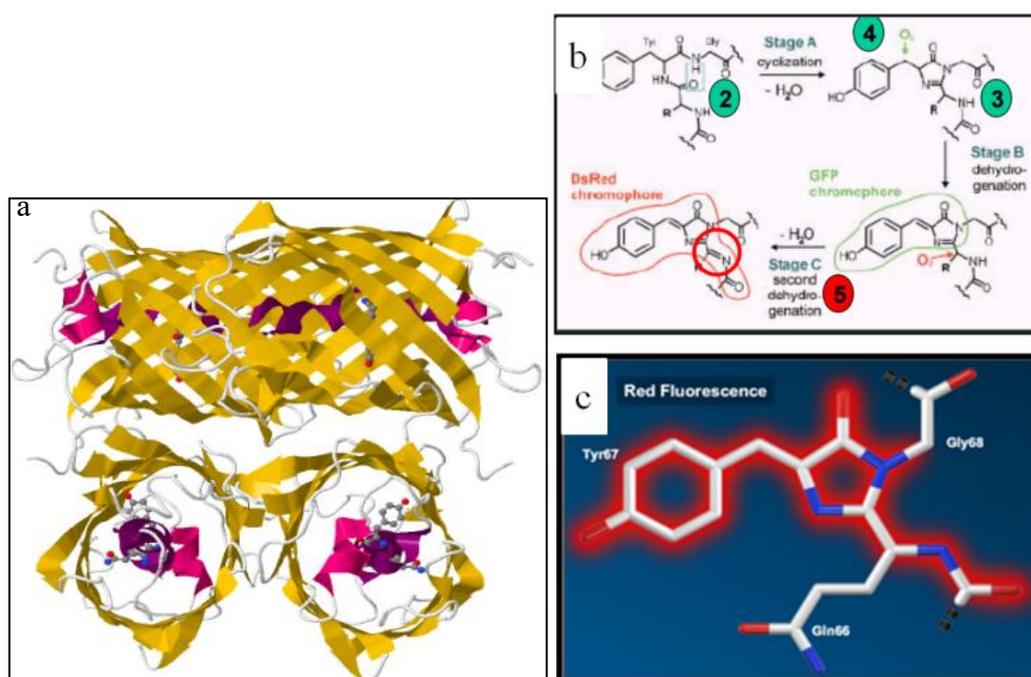


Figure I-8 : (a) Structure secondaire de la Dsred a été obtenue avec Jmol avec la séquence fournie par Biovision, (b) les cinq étapes de la formation du chromophore de la Dsred et (c) le chromophore de la DsRed.

Le tableau I-1 présente les différentes caractéristiques des protéines sélectionnées pour l'étude de l'adsorption. La SAB possède une taille significativement inférieure comparé à la Fn. En effet, la Fn peut mesurer jusqu'à 140 nm dans sa forme dépliée alors que le plus grand axe de la SAB ne mesure que 14 nm. Le monomère de DsRed possède la plus petite taille (4

nm) des trois protéines utilisées mais également le plus petit poids moléculaire (28 kDa) des trois protéines utilisées.

Caractéristiques	SAB	Fn	DsRed
Nom	Sérum albumine Bovine	Fibronectine plasmatique humaine	<i>Discosoma</i> Red fluorescent protein
Poids moléculaire (kDa)	≈ 66	≈ 450 (220 et 212 kDa)	≈ 120 (4*28)
Structure	En forme de cœur	2 sous-unités reliées entre elles	En forme de cylindre
Taille	14 nm de longueur et 4 de hauteur	60-70 nm (1 chaîne) 140 nm (forme dépliée)	3.4 nm x 2.7 nm (Hauteur x diamètre)
Nombre d'acides aminés	582	≈5000 2* (2145-2445)	≈1000 (4* 225)
Point isoélectrique (Pi)	4.7	5.5-6.0	8.0
Propriété spécifique			Fluorescence rouge $\lambda_{excitation} = 558 \text{ nm}$ $\lambda_{émission} = 583 \text{ nm}$

Tableau I-1 : Tableau de synthèse des caractéristiques de la SAB et de la Fn utilisées pour l'étude de l'adsorption protéique.

➤ *Influence de la SAB et de la Fn sur l'adhésion cellulaire*

La SAB, a été sélectionnée, car c'est une protéine modèle bien connue et très étudiée (Carter and Ho, 1994; Gelamo *et al.*, 2002; Lartundo-Rojas, 2007). Le terme albumine regroupe des protéines présentes dans le plasma sanguin chez différentes espèces animales dont l'homme (SAH, Sérum Albumine humaine). Le pourcentage d'homologie de séquences entre la SAB et la HSA est de 76%. Dans la littérature, l'albumine adsorbée aurait un effet inhibiteur sur l'adhésion bactérienne sur les polymères, les céramiques et les métaux (Nuzzo and Allara, 1983; Liang *et al.*, 2000; Senaratne *et al.*, 2005). L'adhésion de *Staphylococcus epidermidis* serait ainsi inhibée à 95% sur une surface en titane recouverte d'albumine humaine (Liang *et al.*, 2000). De même des lapins recevant des implants recouverts de SAB auraient moins d'infections prothétiques (27%) que ceux recevant des implants non recouverts (62%) (Nuzzo *et al.*, 1990). Les mécanismes explicitant cet effet inhibiteur de l'albumine restent encore mal connus. Il semblerait que l'albumine puisse augmenter l'hydrophilie du matériau (Senaratne *et al.*, 2005) et modifier la surface bactérienne en s'y fixant (Chen and Chen, 2006).

La deuxième, la fibronectine est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire et qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. La Fn est

également retrouvée sous sa forme soluble dans le plasma sanguin avec une quantité de 300-500 mg/L. Dans la littérature, divers auteurs ont montré que la Fn augmente l'adhésion et l'étalement des fibroblastes ou de cellules transformées par des oncogènes (qui synthétise peu de fibronectine) sur des substrats inertes (verre ou plastique) ou de nature biologique (collagène, gélatine ou fibrine) (Herrmann *et al.*, 1988; Yamada-Okabe *et al.*, 1999). On sait depuis que la Fn stimule plusieurs types de cellules tels les cellules endothéliales (Iuliano *et al.*, 1993), les cellules osseuses (Yang *et al.*, 2003) et les chondrocytes (Wyre and Downes, 2002). D'autres travaux s'intéressant aux bactéries ont montré que la fibronectine se fixe aux staphylocoques et streptocoques (Mosher, 1980; Ouaisi and Capron, 1985). Les auteurs ont suggéré que la fixation des bactéries aux tissus par le biais de la fibronectine pourrait être un élément favorable au développement de colonies bactériennes (Mosher and Proctor, 1980). Dans une autre étude réalisée par Vaudaux *et al.* (1989), l'adjonction *in vitro* de fibronectine à des cathéters neufs permet d'augmenter l'adhésion de *S. aureus* et *S. epidermidis* à ces supports. Des études plus récentes ont montré que la molécule de fibronectine possède deux sites de liaison aux staphylocoques : le premier dans le domaine N-terminal et le second près du domaine C-terminal (Senaratne *et al.*, 2005). *S. epidermidis* a une plus grande affinité pour le fragment C-Terminal (Fadeeva *et al.*, 2011) et ne se lie qu'à celui-ci (Senaratne *et al.*, 2005). Concernant la levure *C. albicans*, Aliza *et al.* (1988) ont montré l'implication de la fibronectine présente à la surface des cellules épithéliales vaginales (VEC) dans l'adhésion cellulaire de cette levure (Kalo *et al.*, 1988; Campbell and Terranova, 1988). L'interaction entre la fibronectine humaine et *C. albicans* a également été montrée lors de l'étude réalisée par Skerl *et al.* (1983) sur des cellules buccales et vaginales (Skerl *et al.*, 1984). Les expériences menées par Stehen *et al.* (1991) ont montré que l'adhésion de *C. albicans* aux protéines de la matrice extracellulaire était spécifique. Ils ont observé que *C. albicans* se liait à la fibronectine soluble en suggérant que cette liaison pouvait se faire par le biais d'intégrines (Sous-unité β_1) présent à la surface de la levure (Klotz and Smith, 1991).

1.5 Méthodes d'étude de l'adhésion cellulaire sur une surface

L'étape primordiale qui initie la formation du biofilm est l'étape d'adhésion des cellules sur les surfaces. Il devient alors essentiel de mieux comprendre cette étape et de connaître les facteurs déterminants celle-ci. L'adhésion cellulaire est un vaste domaine d'étude qui porte sur la manière dont les cellules interagissent et se lient entre elles ou sur un support d'adhésion. Contrôler l'adhésion cellulaire est primordial au décours de l'utilisation des biomatériaux ou des biocapteurs et est au cœur des domaines en plein essor du génie tissulaire et cellulaire. Au cours de la dernière décennie, le développement de nouvelles techniques de microscopie plus sensibles et plus rapides, ainsi que l'avènement d'outils d'analyse assistés par ordinateur ont permis d'observer et d'analyser l'adhésion unicellulaire avec une meilleure résolution spatiale et temporelle. Dans cette section, nous nous focaliserons sur les méthodes permettant la mesure de la force d'adhésion ou de la contrainte de cisaillement nécessaire pour détacher des cellules d'un substrat d'intérêt. La force appliquée, qui permet le détachement des cellules, est quantifiée comme étant la force d'adhésion cellulaire. De nombreuses approches ont été proposées pour mesurer cette force d'adhésion cellulaire. Les méthodes peuvent être divisées en deux grands groupes impliquant les études sur la cellule unique ou encore des études sur une population cellulaire (Fig. I-9). Généralement, les cellules sont cultivées et mises en contact avec les matériaux d'intérêt qui peuvent être fonctionnalisés par les protéines provenant par exemple de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine...). Cette étape sera alors suivie par une étape impliquant le détachement cellulaire et la mesure de la force d'adhésion.

Dans le cas de la mesure de la force d'adhésion d'une cellule unique, le processus de détachement est axé sur le détachement d'une seule cellule et la valeur mesurée représente la force d'adhésion pour une cellule unique. La force appliquée permet soit de détacher complètement une cellule de son substrat (détachement total de la cellule) ou permet d'obtenir la force nécessaire pour briser les liaisons moléculaires entre la cellule et le substrat (détachement partiel de la cellule) afin de mieux décrire la cinétique d'adhésion cellulaire.

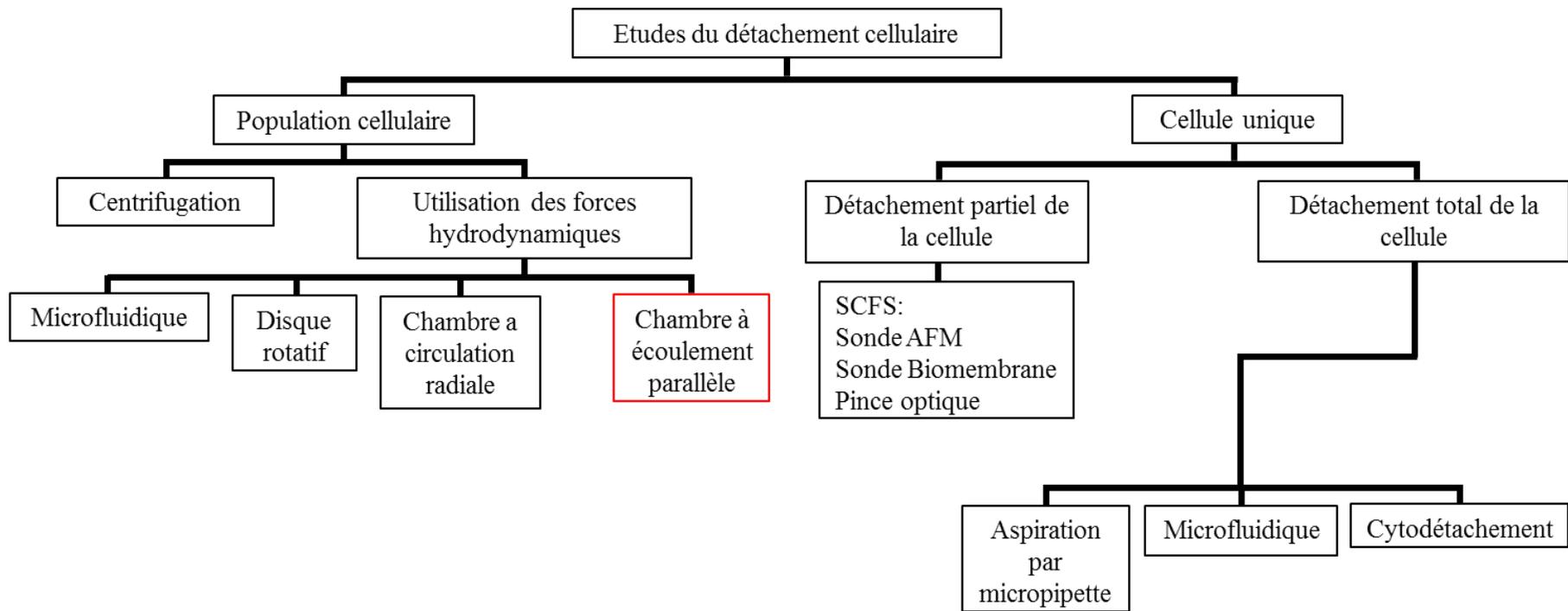


Figure I-9 : Représentation schématique des différentes techniques impliquées dans les études de détachement cellulaire sur une population cellulaire ou une cellule unique adapté de (Ahmad Khalili and Ahmad, 2015).

Les techniques utilisées pour le détachement cellulaire partiel ou total sont les techniques de cytodétachement et d'aspiration par micropipettes ou encore l'application des techniques de spectroscopie de force monocellulaire (SCFS, pour Single Cell Force Spectroscopy) (Fig. I-9). Les études de détachement cellulaire d'une population cellulaire sont effectuées en appliquant une force ou une contrainte sur un ensemble de cellules préalablement adhérentes à un support d'intérêt. À l'issue du processus de détachement, la fraction de cellules qui reste adhérente à la surface est quantifiée. La force ou la contrainte à laquelle 50% des cellules sont détachées est déterminée. Elle est assimilée à la force d'adhésion de la population. Les différentes techniques de mesure de l'adhésion impliquant une population cellulaire peuvent être divisées en quatre catégories. Ces quatre catégories dépendent de la méthode utilisée pour provoquer le détachement cellulaire. On peut citer les essais par centrifugation, l'utilisation d'un disque rotatif, l'utilisation d'une chambre d'écoulement cisailé ou encore de dispositifs en microfluidique (Fig. I-9). Dans cette partie nous porterons une attention particulière aux techniques liées au détachement d'une population cellulaire et notamment à la méthode impliquant l'utilisation d'une chambre à écoulement cisailé, technique mise en œuvre durant cette thèse.

➤ *Utilisation de la centrifugation*

En raison de sa simplicité de mise en œuvre et de la disponibilité des équipements dans la plupart des laboratoires, l'évaluation par centrifugation est l'une des techniques les plus fréquemment utilisées pour mesurer la force d'adhésion des cellules. Les cellules sont dans un premier temps ensemencées dans une plaque multi-puits. Après une étape d'adhésion (contact cellules/support), une centrifugation est réalisée afin de provoquer le processus de détachement cellulaire. Pendant la rotation, les cellules subissent une force centrifuge agissant dans la direction normale en partant du bas de la plaque et qui les éloigne de la surface (Fig. I-10). Pour évaluer la force d'adhésion, le nombre de cellules, avant et après l'application de la force de centrifugation, est quantifié. Dans de nombreux cas, le test est utilisé pour évaluer l'effet relatif des traitements par un type de protéine ou sa concentration. Cette technique a principalement été utilisée pour comprendre l'adhésion de cellules eucaryotes d'organismes multicellulaires. On peut citer comme exemple l'attachement cellulaire à la protéine « VIH-1 Tat » (Channavajjala *et al.*, 1997). Cette technique a également été utilisée par Reyes et Garcia afin d'analyser les capacités d'adhésion de différents types de cellules (HT-1080, NIH3T3 et MC3T3-E1) sur des surfaces conditionnées par différentes concentrations de collagène ou de fibronectine (Reyes and García, 2003).

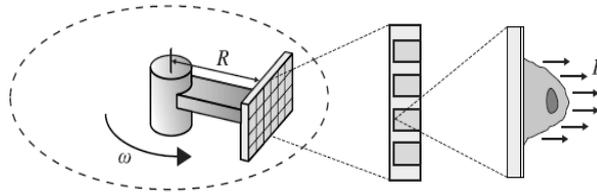


Figure I-10 : Représentation schématique des mesures d'adhésion cellulaire par centrifugation. Une plaque multipuits est scellée avec des puits orientés vers l'extérieur. La force centrifuge agissant au fond des puits est appliquée sur les cellules pour provoquer leur détachement (Christ and Turner, 2010).

➤ Utilisation des forces hydrodynamiques

Les méthodes hydrodynamiques sont largement utilisées et impliquent l'application de contraintes de cisaillement bien contrôlées sur des cellules ayant préalablement adhéré à un substrat. Les quatre dispositifs qui sont les plus couramment utilisés sont (1) le disque rotatif, (2) la chambre à écoulement radial, (3) la chambre d'écoulement à plaques parallèles et (4) une évolution de la chambre à écoulement avec l'utilisation de la microfluidique et la miniaturisation du dispositif (« lab-on-a-chip »). Dans toutes ces méthodes hydrodynamiques, l'écoulement est généralement maintenu dans un régime laminaire près de la cellule. Cela permet de calculer la contrainte de cisaillement appliquée sur la cellule en fonction des débits appliqués. La limite du régime laminaire est déterminée par le nombre de Reynolds et la force d'adhésion est généralement définie comme la contrainte de cisaillement à la paroi pour laquelle 50% de la population initiale de cellules adhérentes se détachent.

1. Utilisation d'un disque rotatif

Cette technique utilise la contrainte de cisaillement générée par un dispositif à disque rotatif avec une plage de rotation de 500 à 3000 tr/min. Les cellules sont d'abordensemencées sur des lamelles de verre circulaires qui sont placées à la surface d'un disque rotatif (diamètre de 10-50 mm) (Fig. I-11) Le disque rotatif est placé dans une chambre remplie de solution tampon. Les pourcentages de cellules adhérentes sont généralement quantifiés par microscopie en comptant le nombre de cellules avant et après rotation (Gallant *et al.*, 2005 ; García *et al.*, 1997). L'avantage de cette technique est l'augmentation linéaire de la contrainte de cisaillement générée au fur et à mesure qu'on s'éloigne du centre du disque. On obtient ainsi une gamme de contraintes qui sera appliquée à la population cellulaire au cours d'une seule expérience. Cette

technique a été utilisée pour étudier et quantifier, par exemple, la force d'interaction de cellules ostéoblastiques sur du verre bioactif (García *et al.*, 1997; García *et al.*, 1998).

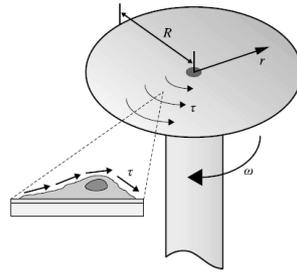


Figure I-11 : Représentation schématique d'une expérience de détachement cellulaire sur disque rotatif. Le disque est en rotation à l'intérieur d'une chambre remplie d'une solution tampon. Les contraintes de cisaillement s'exercent ainsi sur les cellules adhérees à la surface du disque. La contrainte de cisaillement augmente linéairement au fur et à mesure qu'on s'éloigne du centre du disque (Christ and Turner, 2010).

2. Utilisation d'une chambre d'écoulement radiale

Contrairement au disque rotatif, l'utilisation de plaques radiales et parallèles implique un écoulement fluide dans une chambre sur des cellules adhérees à un substrat immobilisé. La technique d'écoulement radial dirige le flux du centre vers l'extérieur d'une chambre circulaire sur un substratensemencé avec des cellules (Fig. I-12). Si la chambre est faite de matériaux optiquement transparents les événements de détachement peuvent être observés à l'aide d'un microscope optique. Cette technique a été utilisée par DiMilla *et al.* (1993) pour étudier l'interaction des cellules musculaires lisses humaines (HSMC) avec différentes concentrations en fibronectine et en collagène de type IV et par Goldstein and Dimilla (1997, 1998) pour les interactions entre des fibroblastes murins et des surfaces de verre fonctionnalisées avec de la fibronectine. Les résultats ont montré que la force d'adhésion était relativement insensible à une concentration de fibronectine allant jusqu'à $0.23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mais augmentait sensiblement ensuite à une concentration de $0.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Quelques études attestent également de l'utilisation de cette technique avec des cellules procaryotes et notamment avec la bactérie *E. coli* K12-D21 (Walker *et al.*, 2004).

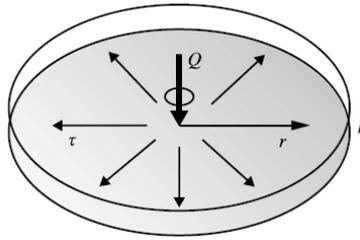


Figure I-12 : Schéma de la chambre à écoulement radial. Le flux entre dans la chambre circulaire à partir du centre et se déplace vers l'extérieur entraînant une contrainte de cisaillement sur les cellules collées sur la surface inférieure. Dans cette configuration la contrainte de cisaillement diminue de manière non linéaire lorsque la distance radiale augmente (Christ and Turner, 2010).

3. Utilisation d'une chambre à écoulement parallèle

Les chambres à écoulement parallèle sont souvent utilisées pour caractériser la force d'adhésion des cellules. Dans ces systèmes, le flux est bien défini et les chambres peuvent être montées sous un microscope pour permettre l'observation directe des cellules dans le temps (Fig. I-13). Le débit est souvent généré par pression hydrostatique à partir d'un réservoir surélevé et à l'aide d'une pompe automatique (Truskey and Pirone, 1990). Pour un débit donné, la contrainte de cisaillement à la paroi sera constante sur toute la longueur du canal, mais il peut varier sur la largeur en fonction des dimensions du canal. Le système de plaques parallèles a notamment été utilisé pour l'évaluation de l'adhésion de cellules endothéliales à différents matériaux dont des films multicouches de polyélectrolyte (Boura *et al.*, 2005), des films en polyéthylène (Lee *et al.*, 2000), les films en poly-L-lactide (PLL) (Renshaw *et al.*, 2005), les SAM d'organosilanes (Kapur and Rudolph, 1998), et le polyuréthane (Khang *et al.*, 2000). Des formes modifiées de la chambre ont également été utilisées. La plus commune est la variation de la hauteur et/ou largeur le long du canal permettant de générer une gamme de contraintes (Usami *et al.*, 1993). Par exemple, cette géométrie particulière a été utilisée pour examiner l'adhésion d'hépatocytes sur du polystyrène revêtu de Matrigel (solution constituée de plusieurs protéines et d'autres facteurs biologiques) (Powers *et al.*, 1997). Cette méthode a été appliquée à des levures. Ainsi, Saulou *et al.* (2012) ont étudié l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* à des films nanocomposites à base de nanoparticules d'argent déposés sur des coupons d'acier inoxydable à l'aide d'une chambre à écoulement cisailé. L'étude réalisée a permis de mettre en évidence une activité antiadhésive des dépôts inversement liée à la quantité en argent des différents dépôts testés. D'autres matériaux comme le verre et l'acier inoxydable ont également été utilisés par G. Guillemot *et al.* (2006, 2007) pour étudier l'adhésion de *S. cerevisiae*. Les contraintes de cisaillement pariétales obtenues dans la chambre à écoulement parallèle sont généralement de l'ordre de 1 à 80 Pa.

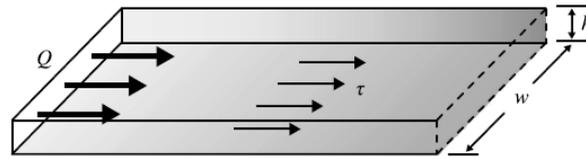


Figure I-13 : Schéma de la chambre d'écoulement à plaques parallèles. Le flux entre à une extrémité et traverse le canal en appliquant une contrainte de cisaillement aux cellules adhérentes sur le fond (Christ and Turner, 2010).

4. Utilisation de la microfluidique

Au cours des dernières années, l'adhésion cellulaire a également été étudiée en utilisant un écoulement dans des canaux microfluidiques pour l'application de fortes contraintes de cisaillement. Un exemple de puce de laboratoire est illustré dans la figure I-14.

Les technologies microfluidiques de type « lab-on-a-chip » représentent une révolution en apportant les avantages de la miniaturisation, de l'intégration et de l'automatisation pour de nombreuses applications notamment dans le secteur de la recherche. L'utilisation de petits volumes d'échantillons permet également d'obtenir une plus grande efficacité des interactions chimiques avec une faible consommation en réactifs. Les coûts de production par appareil sont également réduits, ce qui permet d'obtenir des temps d'échantillonnage rapides et de disposer de produits jetables. La capacité d'observation en temps réel constitue également un atout majeur. Ces dispositifs sont généralement construits à partir de polydiméthylsiloxane (PDMS) optiquement transparents, collés sur du verre (Xia and Whitesides, 1998). La transparence optique permet une utilisation de différentes techniques de microscopie en temps réel pour explorer les comportements cellulaires en appliquant différentes conditions expérimentales (K. Young *et al.*, 2007). Les canaux mesurent généralement moins de 100 μm , et par conséquent, des contraintes de cisaillement de plusieurs centaines de Pa peuvent être générées dans des conditions d'écoulement laminaire (Gervais *et al.*, 2006). Par exemple, un dispositif microfluidique composé de huit canaux parallèles a été utilisé pour évaluer l'effet de différentes concentrations en collagène et fibronectine sur la force d'adhésion de cellules endothéliales (K. Young *et al.*, 2007). Cette approche a été appliquée à d'autres revêtements et d'autres types cellulaires (Lu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008).

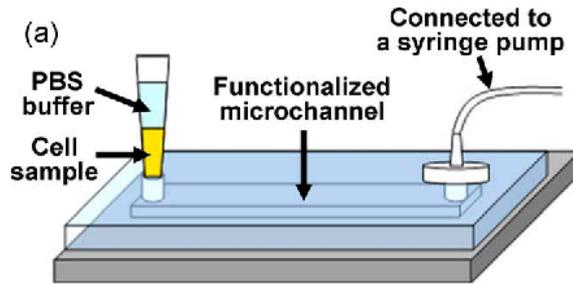


Figure I-14 : Exemple d'illustration d'une puce de laboratoire possédant un canal microfluidique pouvant être fonctionnalisé. L'entrée du canal est connectée à un réservoir contenant une suspension microbienne et la sortie du canal à un pousse seringue (Cheung *et al.*, 2010).

Dans ce chapitre, nous avons examiné les méthodes les plus fréquemment utilisées pour mesurer les forces d'adhésion de différents types de cellules ayant adhérees à des surfaces qui pouvaient également être fonctionnalisés par des protéines de la MEC. Le tableau I-2 présente les différents avantages et inconvénients rencontrés avec l'utilisation des différentes méthodes d'étude de l'adhésion d'une population cellulaire sur une surface.

Types de forces	Méthode	Force typique de mesure*	Avantages	Limitations et défis	Références
Utilisation de la force corporelle sur les cellules	Centrifugation	10 ⁻⁶ -0.02 Pa	Plusieurs conditions peuvent être examinées en parallèle Équipement commun en laboratoire	Force maximale faible Une seule force peut être appliquée par expérience	(Channavajjala <i>et al.</i> , 1997; Reyes and García, 2003; Christ and Turner, 2010; Ahmad Khalili and Ahmad, 2015)
Application de forces hydrodynamique	Disque rotatif	1-350 Pa	Gamme de contraintes dans une seule expérience Stress élevé	Pas de visualisation directe des cellules Appareils sur mesure	(García <i>et al.</i> , 1997; García <i>et al.</i> , 1998; Miller and Boettiger, 2003; Gallant <i>et al.</i> , 2005; Christ and Turner, 2010; Ahmad Khalili and Ahmad, 2015)
	Chambre à circulation radiale	1-20 Pa	Gamme de contraintes dans une seule expérience Visualisation directe des cellules Application de flux laminaire	Faible stress maximum	(DiMilla <i>et al.</i> , 1993; Walker <i>et al.</i> , 2004; Christ and Turner, 2010; Ahmad Khalili and Ahmad, 2015)
	Chambre à écoulement parallèle	0.01-80 Pa	Construction et opération simple Visualisation directe des cellules Intégration gamme diversifiée de matériaux Application de flux laminaire Hauteur, largeur et longueur variables du canal d'écoulement Utilisation possible d'un pousse seringue (faibles contraintes)	Stress moyen maximum Application difficile de différentes conditions expérimentales	(Truskey and Pirone, 1990; Usami <i>et al.</i> , 1993; Powers <i>et al.</i> , 1997; Khang <i>et al.</i> , 2000; Guillemot <i>et al.</i> , 2006; Guillemot <i>et al.</i> , 2007)
	Chambre microfluidique (lab-on-chip)	1-400 Pa	Stress maximal élevé Visualisation directe des cellules Transport et miniaturisation du système Utilisation de faibles volumes de réactifs Possibilité de construire dispositif jetable Application de flux laminaire Possibilité d'automatisation	Possibilité restreinte d'introduction et d'inter-changement d'un matériau à analyser	(Xia and Whitesides, 1998; Lu <i>et al.</i> , 2004; K. Young <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2008; Christ and Turner, 2010; Cheung <i>et al.</i> , 2010)

*1 Pa = 1N/m² (avec N en newton et m en mètre) Une pression d'un pascal est une contrainte uniforme qui, agissant sur une surface plane de 1 mètre carré, exerce perpendiculairement à cette surface une force totale de 1 newton.

Tableau I-2 : Comparaison des avantages et inconvénients impliqués lors de l'utilisation de techniques permettant la mesure de la force d'adhésion cellulaire. En rose, la méthode sélectionnée : chambre à écoulement parallèle.

Chaque méthode décrite dans cette section est unique et a été développée pour des objectifs spécifiques, ce qui les rend difficiles à comparer entre elles pour trouver la meilleure méthode applicable. Le choix d'une technique appropriée dépend alors fortement de l'objectif de l'étude. Dans le cadre de cette thèse, nous avons fait le choix d'utiliser une chambre à écoulement cisailé pour étudier l'adhésion de *C. albicans* sur différents types de substrats nanocomposites. En effet, cette technique possède l'avantage de pouvoir permettre l'insertion et l'analyse d'échantillon préalablement préfabriqué tout en permettant l'application d'une gamme de contraintes de cisaillement pariétales. La génération de faibles débits à l'aide d'un pousse seringue par exemple, permet d'obtenir dans la chambre à écoulement des contraintes de cisaillement très faibles (>0.01 Pa). Ce système peut également être couplé à une pompe péristaltique permettant de générer des débits importants et par conséquent des contraintes élevées. La géométrie de la chambre permet également l'obtention d'un flux laminaire dans la chambre à écoulement cisailé. De plus, cette technique permet également la récupération des substrats analysée en fin d'expérimentation pour des analyses secondaires ou complémentaires (utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformé de fourrier FTIR, par exemple).

2. Multifonctionnalité des nanoparticules d'argent et intérêts de leur utilisation dans la conception des couches minces nanocomposites

L'argent (Ag), un métal précieux de couleur gris clair et brillant, est connu pour limiter la propagation des infections et améliorer l'hygiène quotidienne depuis plus de 7000 ans (Lansdown, 2002; Silver *et al.*, 2006). Les Romains ont utilisé le nitrate d'argent (AgNO_3) pour soigner des blessures, des brûlures et des ulcères (Klasen, 2000). Dès l'identification des bactéries comme agents responsables des infections, les qualités antimicrobiennes de l'Ag, attribuées au relargage d'ions Ag^+ ont été admises (Klasen, 2000). Par exemple, pendant la première Guerre mondiale, les composés à base d'Ag étaient des remèdes majeurs contre les infections. De nombreux produits à base d'Ag, comme des crèmes composées de sulfadiazine d'Ag ont été utilisés jusqu'à la découverte des antibiotiques (Silver *et al.*, 2006).

L'augmentation des phénomènes de résistance bactérienne ou fongique acquise aux antibiotiques ou antifongiques actuels a rapidement incité les chercheurs à se tourner vers d'autres solutions. Dans ce contexte, les nanoparticules d'Ag (AgNPs) appelées également "nano-argent", ont été proposées en tant que « nouvel » agent antimicrobien innovant et d'une grande efficacité. De manière générale, leurs fonctionnalités spécifiques sont dues à leur rapport surface/volume élevé, à leurs stabilités thermiques, à leurs faibles volatilités et surtout à leurs faibles toxicités pour les humains (Foldbjerg and Autrup, 2013; Barillo and Marx, 2014; Marx and Barillo, 2014). Cependant, leur large utilisation est très controversée sur les aspects toxicologiques et surtout écotoxicologiques (ANSES, 2014).

Les AgNPs sont des nano-objets composés d'atomes d'argent, possédant des dimensions comprises entre 1 et 100 nm (ISO/TS 80004-1, 2015 ; Calderón-Jiménez *et al.*, 2017). Elles peuvent contenir un nombre considérable d'atomes d'Ag (10^3 - 10^6) qui varie principalement en fonction de la taille de la nanoparticule. Elles peuvent être élaborées par voies chimiques ou par voies physiques et présentent diverses morphologies. A leurs principales caractéristiques physiques qui sont la taille, la forme (quasi-sphérique, barres...), la maille cristalline des nanoparticules, se rajoutent la nature de l'enveloppe des AgNPs, par exemple en cas d'une particule de type « core-shell » ou d'une fonctionnalisation chimique par des ligands (Fig. I-15).

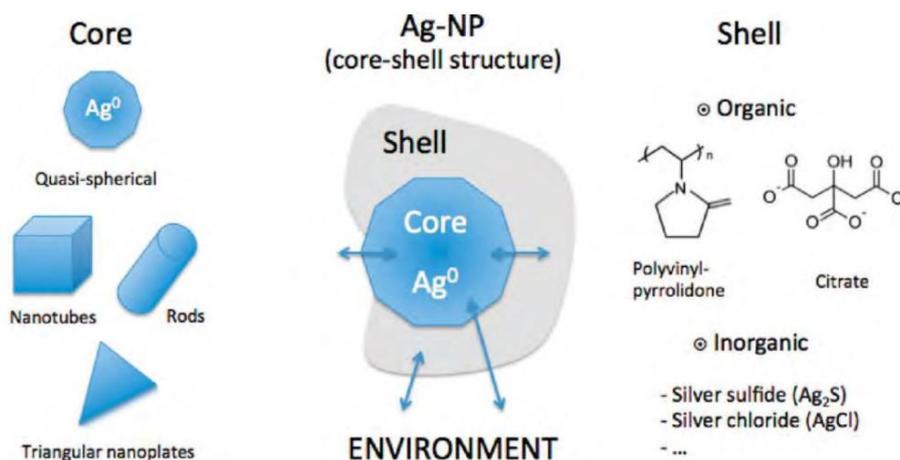


Figure I-15 : Structure typique des AgNPs avec un noyau polymorphe d'argent métallique et une couche de recouvrement continue ou discontinue (coquille). Les doubles flèches représentent les réactions qui peuvent se produire entre la coquille (organique ou inorganique) ou le noyau d'argent (directement ou indirectement) avec l'environnement et aussi à l'interface entre le noyau et l'enveloppe (Levard *et al.*, 2012).

En plus de leurs fonctionnalités antimicrobiennes, les AgNPs sont également étudiées pour leurs propriétés optiques exceptionnelles. Les AgNPs permettent d'obtenir une résonance plasmonique de surface localisée (LSPR pour Localized Surface Plasmon Resonance) très aiguë. En effet, les AgNPs constituent la meilleure antenne à l'échelle nanométrique pour amplifier les signaux électroniques et vibrationnels locaux dans le domaine du visible. Cette amplification des signaux peut fournir des informations uniques à l'échelle moléculaire pour des molécules localisées à leur voisinage. Dans ce domaine, deux principales techniques de spectroscopie basées sur la LSPR et la diffusion Raman amplifiée par la surface (SERS pour Surface Enhanced Raman Scattering) ont émergé. L'utilisation de l'effet SERS nécessite des substrats contenant des AgNPs, dits « plasmoniques ». Cette approche permet de décrire des interactions se produisant à l'interface entre les microorganismes et les substrats plasmoniques sur lesquels ils adhèrent. Dans ce travail de thèse nous allons nous servir de la multifonctionnalité des AgNPs à la fois en tant qu'agent antimicrobien et en tant qu'élément de base pour l'élaboration de substrats plasmoniques et l'application de la spectroscopie Raman.

2.1 Activité antimicrobienne des AgNPs : Interaction des AgNPs avec des microorganismes

Les AgNPs présentent une efficacité antimicrobienne propre, fonction notamment de leur morphologie (Morones *et al.*, 2005; Lok *et al.*, 2007; Levard *et al.*, 2012). L'utilisation des AgNPs connaît un essor très important depuis le début des années 2000 (Nilsson *et al.*, 2010). Les progrès réalisés dans le développement des nanotechnologies permettent d'introduire des AgNPs dans divers produits de consommation et dans de nombreuses applications médicales (prothèses osseuses, pansements, instruments chirurgicaux...). Les AgNPs sont présentées comme actives contre les bactéries à Gram positif et négatif, les champignons, les protozoaires, certains virus et des algues. L'efficacité de leur activité antimicrobienne dépend de leurs principales caractéristiques physiques. Concernant la taille des AgNPs, l'amélioration de l'activité antimicrobienne observée peut provenir de deux principaux facteurs. Le premier facteur est la dissolution de l'AgNP sous forme d'Ag⁺ qui joue le rôle le plus important dans la toxicité contre les microorganismes. Si l'on considère des AgNPs sphériques de taille uniforme, la réduction de la taille des particules de 10 µm à 10 nm augmente la surface spécifique de la nanoparticule d'un facteur de 10⁹. Par conséquent, les AgNPs de plus petite taille présentent une surface plus réactive par unité de masse et sont donc susceptibles d'induire une libération d'Ag⁺ plus importante (Fig. I-16) (Lok *et al.*, 2007; Sotiriou and Pratsinis, 2010).

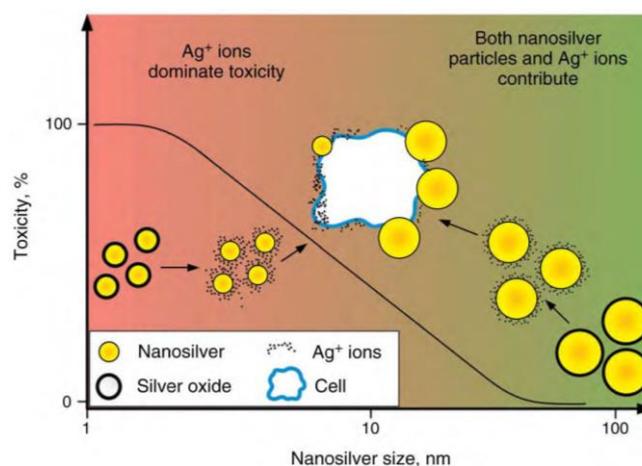


Figure I-16: Comportement antimicrobien des AgNPs en fonction de la taille, exprimé en termes de toxicité sur la base d'une teneur totale équivalente en masse d'argent (Sotiriou *et al.*, 2011).

Le deuxième facteur qui peut également expliquer l'activité antimicrobienne plus accrue des AgNPs de petites tailles est la différence entre les niveaux d'association des AgNPs avec

les cellules. Les AgNPs de petites tailles peuvent plus facilement s'attacher directement à la surface de la membrane cellulaire. Elles perturbent ainsi considérablement et directement le bon fonctionnement de la cellule (Morones *et al.*, 2005). Cette efficacité de l'activité antimicrobienne des AgNPs présentant un diamètre compris entre 1 et 10 nm a été démontrée vis-à-vis de bactéries à Gram négatif (CMI = 75 mg/L) (Morones *et al.*, 2005).

L'interaction des AgNPs avec les microorganismes se réalise à plusieurs niveaux. Les AgNPs peuvent se déposer à la surface de la membrane cellulaire en interagissant avec la paroi du microorganisme. Elles peuvent aussi pénétrer à l'intérieur des microorganismes en contournant les mécanismes de défense mis en jeu pour des particules de taille plus importante. Ceci a notamment été mis en évidence chez *S. cerevisiae* (Despax *et al.*, 2011) (Figs. I-17 et 18).

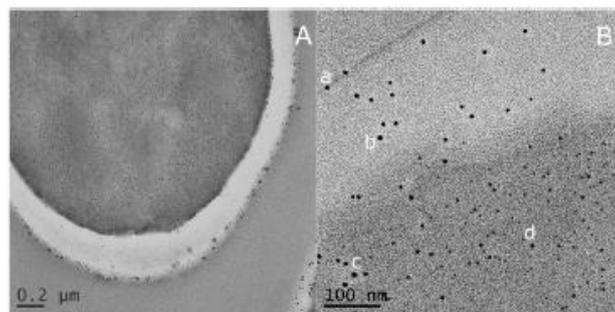


Figure I-17 : Images MET d'une section ultra-mince de *S. cerevisiae* après contact avec le revêtement contenant du nano-argent ; (a) vue large ; (b) vue détaillée de la paroi cellulaire et d'une partie du cytoplasme (Despax *et al.*, 2011).

Lorsque les AgNPs s'accumulent au niveau de la membrane cellulaire, elles peuvent provoquer des altérations de la structure pariétale (Fig. I-18). Ces altérations entraînent une augmentation de la perméabilité avec la libération des constituants cellulaires, une dérégulation des phénomènes de transport et par la suite la mort cellulaire (bactéries et levures).

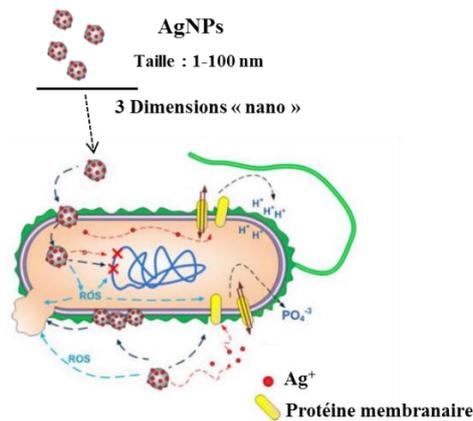


Figure I-18: Schéma récapitulatif illustrant l'interaction des AgNPs avec des cellules bactériennes (Vimbela *et al.*, 2017).

A l'intérieur de la cellule, les AgNPs sont également capables d'interagir avec différents groupements biologiques dont des composés contenant du phosphore comme l'ADN (Yang *et al.*, 2009) ou les groupements sulfures des protéines (notamment enzymes) (Fig. I-18). Des décalages significatifs des bandes amide I ($1600-1720\text{ cm}^{-1}$) et amide II ($1480-1600\text{ cm}^{-1}$) ont été observé lors de l'analyse de levures mises en contact avec une couche mince organosiliciée contenant des AgNPs (Saulou, 2009) (Fig. I-19). Le décalage de ces bandes qui sont caractéristiques des liaisons peptidiques des protéines cellulaires révèle bien l'interaction entre les AgNPs et les protéines. L'implication des AgNPs dans la perturbation des fonctions cellulaires, comme la respiration, a également été démontrée (Morones *et al.*, 2005).

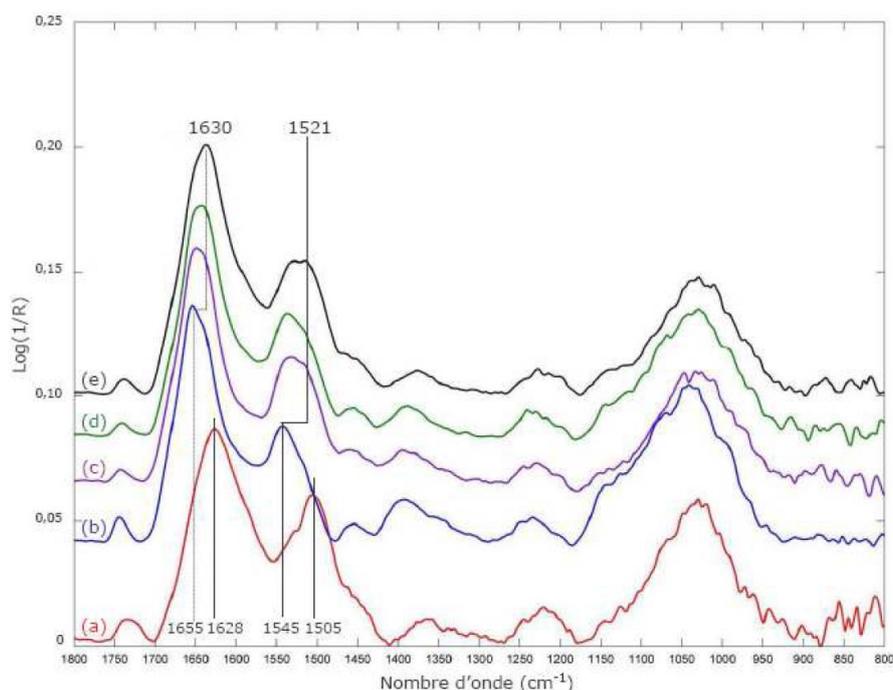


Figure I-19 : Spectres FTIR bruts des levures *S. cerevisiae*, au niveau de la région 1800 – 800 cm^{-1} , enregistrés sur les échantillons (a), (b), (c), (d) et (e). (a) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 2 h d'exposition à une concentration létale de nitrate d'argent (2 mM d' AgNO_3 , dans de l'eau osmosée ; Guillemot *et al.*, 2008) ; (b) échantillon « contrôle » correspondant aux levures « fraîches », cultivées en milieu YPD gélosé puis resuspendues dans de l'eau déionisée ; (c) échantillon « contrôle » correspondant aux levures après 24 h en suspension dans la solution saline (NaCl 0.15 M) ; (d) échantillon « témoin » correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt A de matrice organosiliciée en solution saline (Saulou *et al.*, 2010); (e) échantillon correspondant aux levures après 24 h de contact avec le dépôt nanocomposite D en solution saline (Saulou *et al.*, 2010). Les décalages des bandes amide I et amide II dans le cas des levures après contact avec le dépôt nano composite (e), par rapport aux levures « contrôle » viables (b) et aux levures « contrôle » mortes (a), sont indiqués sur la figure (Saulou, 2009; Saulou *et al.*, 2010).

Cependant, le mécanisme réel de l'effet antimicrobien des AgNPs reste à éclaircir. Les études menées sur l'interaction des AgNPs avec les microorganismes proposent deux voies non exclusives (Upadhyay *et al.*, 2016; Dakal *et al.*, 2016) : (1) via les ions d'argent Ag^+ relargués par les AgNPs et (2) via un contact direct entre les AgNPs et les microorganismes (Despax *et al.*, 2011).

➤ *Activité antimicrobienne des ions Ag^+*

Sans distinguer la source d' Ag^+ (relargués des AgNPs ou provenant de sels d'argent) nous présentons ici l'activité antimicrobienne des Ag^+ telle que décrite dans la littérature. Contrairement aux antibiotiques ou antifongiques, les ions Ag^+ provoquent très rarement l'émergence de résistance de la part des bactéries ou des levures (Lampert, 1964). Du fait de

leur large spectre d'action, les ions Ag^+ peuvent interagir aussi bien avec des bactéries à Gram positif que négatif, qu'avec des levures, des champignons filamenteux ou des virus. Les ions Ag^+ hautement réactifs, affectent des sites multiples dans les cellules microbiennes causant en définitive leur destruction pour des temps de contact relativement courts. Ils peuvent se lier aux membranes des cellules bactériennes et provoquer ainsi la rupture de leur paroi cellulaire et l'altération de leur intégrité cellulaire. Ces dommages augmentent la perméabilité membranaire et facilite la sortie des constituants cellulaires, ainsi que la pénétration des ions Ag^+ (Pierard *et al.*, 2004). Leur activité est donc assimilée à celle des molécules de type antiseptique ou désinfectant et leur permet d'agir sur les cellules présentant des mécanismes de résistance aux antibiotiques/antifongiques. Au niveau cellulaire, les ions Ag^+ chargés positivement sont capables d'interagir avec de nombreux groupements chargés négativement (thiols), carboxyles, carbonyles, hydroxyles, phosphates, amines, amides, etc (Liau *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2004; Pugliara, 2016) qui sont des composants élémentaires des molécules biologiques (protéines et enzymes pariétales et intracellulaires, ADN et ARN). Les Ag^+ en se liant aux groupements phosphates reliant les bases des molécules d'ADN forment un complexe Ag/ADN et dans ces conditions, l'ADN condensé ne peut plus se répliquer et la cellule arrête de se multiplier (Fox and Modak, 1974; Feng *et al.*, 2000). Ainsi, les Ag^+ transportés dans la cellule perturbent les fonctions cellulaires en se liant aux protéines et en interférant sur la production d'énergie, les fonctions enzymatiques et la réplication cellulaire (Fig. I-19) (Kaegi *et al.*, 2011; Levard *et al.*, 2012; Lowry *et al.*, 2012; Colman *et al.*, 2013; Dale *et al.*, 2013). Le détachement de la membrane cytoplasmique ou encore sa détérioration (présence de trous) sont des modifications qui ont également été observées. Les ions Ag^+ comme d'autres ions métalliques, interagissent avec les enzymes de la chaîne respiratoire (ex : NADH déshydrogénase) et empêchent le transport des électrons d'un complexe à l'autre de cette chaîne. Ils provoquent le découplage entre la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative (donc la synthèse d'ATP), inhibent la force proton-motrice à travers la membrane cellulaire et altèrent la structure et l'activité des protéines impliquées dans le transport transmembranaire (Holt and Bard, 2005). L'inhibition de la respiration bactérienne est également corrélée à la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) et à une perte de viabilité avec un arrêt de la croissance cellulaire. L'ensemble de ces phénomènes conduit à l'amplification des dérèglements fonctionnels cellulaire et à terme à la mort du microorganisme.

En ce qui concerne spécifiquement l'interaction des Ag^+ avec des levures, la littérature est moins importante (Kierans *et al.*, 1991). Les principaux modes d'action répertoriés pour les bactéries semblent se produire également chez les levures avec des différences dues à la

compartimentation interne et à la structure de la paroi fongique. En se liant à un résidu cystéine (Cys-150), les ions Ag^+ inhibent de manière irréversible la phosphomannose isomérase, une enzyme clé impliquée dans la synthèse des mannoprotéines pariétales. Son altération provoque une augmentation de la perméabilité de la paroi et conduit à la libération de phosphates, de glutamine et autres nutriments vitaux pour la levure. Le détachement de la paroi et de la membrane cytoplasmique, la destruction des organites intracellulaires ainsi que la présence d'amas d'Ag au niveau de la paroi ont été observés pour *S. cerevisiae* (Despax *et al.*, 2011). Cependant, très peu d'amas sont détectés à l'intérieur des levures par rapport aux observations réalisées sur les bactéries (Kierans *et al.*, 1991). Constituant une cible privilégiée des ions Ag^+ , les mitochondries des organismes eucaryotes peuvent également être dégradées (fragmentation de leur réseau de structures tubulaires) ce qui se traduit par une altération de la chaîne respiratoire (Yang and Pon, 2003). Cette observation est confirmée par une activité antifongique vis-à-vis de *S. cerevisiae* qui est plus importante lorsque la levure est cultivée sur un milieu contenant du glycérol (substrat obligeant la levure à « respirer »), que sur un milieu à base de glucose (métabolisme fermentaire). Selon Yang et Pon (2003), les ions Ag^+ induisent la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS), provoquant un stress oxydatif dans les cellules (dégradation des lipides, des protéines et de l'ADN). Ces ROS générés par différentes réactions enzymatiques et notamment par des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale contribuent à la toxicité des ions Ag^+ chez les levures. Ainsi l'efficacité des ions Ag^+ vis-à-vis de quatre souches eucaryotes (*C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* et *Aspergillus flavus*) a été démontrée par Jung *et al.* (2007). Dans une autre étude, la structure interne de différentes levures (*Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*), a été retrouvée affectée lorsque les microorganismes sont cultivés en présence d'ions Ag^+ (Kierans *et al.* 1991).

Les AgNPs représentent un « réservoir » d' Ag^+ permettant d'exercer une activité antimicrobienne pendant un laps de temps important (Morones *et al.*, 2005; Sardella *et al.*, 2006; Egger *et al.*, 2009; Pugliara *et al.*, 2016). En effet, les AgNPs sont plus réactives que l'argent massif (Pal *et al.*, 2007). Les Ag^+ sont progressivement libérés par oxydation de la surface des nanoparticules lors de l'exposition à l'air ou à un milieu humide, puis par dissolution de l'oxyde d'argent dans le milieu environnant (phénomène de « leaching ») (Pugliara *et al.*, 2016). Avec la libération des ions Ag^+ et par la suite leur interaction avec les cellules microbiennes, l'activité des AgNPs est amplifiée.

Toutes les données recueillies dans la littérature montrent bien l'activité biocide à large spectre que possèdent les AgNPs. Cette activité est due au relargage progressif et contrôlé

d'ions Ag^+ , mais également à une efficacité propre aux AgNPs fonction de leur forme et de leur taille, qui s'effectue par interaction directe avec les cellules. Cependant, certains facteurs peuvent affecter l'activité des AgNPs. Par exemple, le milieu salin, qui est naturel pour tous les liquides corporels, atténue l'activité antimicrobienne des Ag^+ en favorisant la formation de chlorure d'argent (AgCl). Le contact direct entre les microorganismes et les AgNPs est indispensable pour que l'activité antimicrobienne des AgNPs soit maintenue. Ces différents facteurs seront décrits dans la section suivante.

➤ *Activité antibactérienne des AgNPs : facteurs d'influence*

Nous avons souligné que l'activité antibactérienne des AgNPs dépend de leur morphologie et en particulier de leur taille. Les AgNPs possédant une surface identique mais des formes différentes (en termes de facettes), peuvent présenter une activité antimicrobienne différente. Ces différences concernent les densités des différents plans cristallins ; une densité plus importante signifie énergie plus faible et par conséquent plus de stabilité (Marzbanrad *et al.*, 2015).

Le deuxième facteur pouvant influencer l'activité antimicrobienne des AgNPs est la présence d'arêtes et de coins vifs (nanoplaques triangulaires, nanorods, nanocubes) (Fig. I-15). En effet, ces formes possèdent une courbure localement améliorée ce qui provoque une dissolution préférentielle de l'Ag à ces emplacements (Zhang *et al.*, 2005; Sotiriou and Pratsinis, 2010). Par rapport à leurs homologues sphériques ou sous forme de bâtonnets (Pal *et al.*, 2007), les AgNPs avec une forme de pyramides triangulaires présentent la toxicité la plus élevée vis-à-vis d'*E. coli*.

Un autre paramètre pouvant affecter les propriétés physico-chimiques des AgNPs en provoquant des modifications de leur activité antimicrobienne est la nature du revêtement qui les entourent (Navarro *et al.*, 2015). Ainsi, les AgNPs enrobées de polymères organiques ont une meilleure stabilisation de la surface (correspondant à un état d'agrégation élevé des NP) et donc une activité antimicrobienne plus faible que celles qui sont enrobées d'un surfactant anionique organique (Kvítek *et al.*, 2008). La quantité d' Ag^+ relarguée peut être réduite par la couverture partielle ou totale de la surface des AgNPs par le revêtement. L'effet chimique engendré par la nature du revêtement peut également influencer la quantité d'ions Ag^+ relargués dans la solution, par exemple par mise en jeu de mécanismes de complexation. La charge superficielle et l'hydrophobicité des AgNPs peuvent également être modifiées par la présence du revêtement, induisant des modifications en termes de relargage d' Ag^+ et donc d'activité antimicrobienne. En effet, en fonction du type de charge de la cellule et des AgNPs on peut

observer une influence sur l'interaction « cellule-AgNPs ». Une diminution de l'interaction AgNPs-cellules est observée lorsque la charge de surface des AgNPs et celle des microorganismes sont négatives, conduisant à une réduction de la toxicité des AgNPs sur les microorganismes (El Badawy *et al.*, 2011). Dans le cas inverse, si les AgNPs possèdent une charge de surface positive, celles-ci montrent une attraction électrostatique envers les cellules provoquant une toxicité significativement plus élevée (El Badawy *et al.*, 2011). Un autre facteur qui joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne est l'hydrophobicité des AgNPs. Les microorganismes hydrophobes et en particulier les bactéries semblent avoir une meilleure interaction avec les AgNPs que les microorganismes hydrophiles (levures...) (An and Friedman, 1998).

Une fois synthétisées, les AgNPs peuvent subir des modifications chimiques et physiques qui influencent fortement leurs propriétés optiques uniques et leur disponibilité vis-à-vis des systèmes biologiques. En général, l'interaction abiotique entre les AgNPs et les différents agents présents dans l'environnement atmosphérique, aquatique ou terrestre (par exemple, présence de lumière, espèces oxydantes, présence d'autres ligands potentiels pour l'argent...) est la première étape de leur modification (Navarro *et al.*, 2008). Les modifications des AgNPs peuvent augmenter ou réduire les différents mécanismes situés aux interfaces biologiques comme l'absorption des sous-produits des AgNPs (Ag^+), la voie d'entrée dans les organismes ou leur disponibilité à l'intérieur des cellules. Dans l'air atmosphérique, deux éléments bien connus peuvent interagir avec les AgNPs. Le premier élément est l'oxygène qui est présent naturellement dans l'air ambiant dans les conditions standard ambiantes (température de 25°C et 100 kPa) et c'est également l'élément principal réagissant fortement avec l'Ag (Lide and Haynes, 2009) pour former de l'oxyde d'argent (Ag_2O) (mécanisme d'oxydation). Le deuxième élément est le soufre avec lequel on obtient du sulfure d'argent (Ag_2S) (mécanisme de sulfuration).

À cause de leur grande surface qui facilite l'exposition à l' O_2 , les AgNPs sont beaucoup plus réactives que l'argent massif. Dans une solution, le processus d'oxydation-dissolution peut être directement influencé par le pH de la solution et est favorisé dans des conditions acides (Peretyazhko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Une réaction intermédiaire avec la formation d' H_2O_2 peut également favoriser cette dissolution (Zhang *et al.*, 2016). Un autre paramètre pouvant affecter la cinétique d'oxydation des AgNPs est l'humidité relative de l'air ambiant. En effet, un fort taux d'humidité aura tendance à augmenter l'oxydation des AgNPs.

Si l'on s'intéresse maintenant au soufre qui est présent dans l'atmosphère sous forme de composés gazeux soufrés (sulfure d'hydrogène H_2S , sulfure de carbonyle (OCS), dioxyde de

soufre (SO_2) et de disulfure de carbone (CS_2)), on s'aperçoit qu'il peut provoquer la formation de sulfure d'argent Ag_2S (argentite) sur la surface de l'Ag. La sulfuration des AgNPs est un processus observé principalement dans des systèmes hypoxiques et anoxiques où les niveaux des ions de soufre (S^{2-}) sont élevés (usines de traitement des eaux usées, sols riches en S, endroits possédant un fort taux en sédiments) (Kaegi *et al.*, 2011; Levard *et al.*, 2012; Lowry *et al.*, 2012; Colman *et al.*, 2013; Dale *et al.*, 2013). Les ions de soufre (S^{2-}) peuvent interagir également avec les AgNPs en présence d'oxygène (l'oxysulfuration) dans des conditions hypoxiques (Liu *et al.*, 2011). En raison de la faible solubilité des Ag_2S (Levard *et al.*, 2012), un précipité sous forme de sel se forme et peut être retrouvé autour des AgNPs (Levard *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). La sulfuration directe peut également se produire et induit également la formation d'une couche d' Ag_2S à la surface des AgNPs (Liu *et al.*, 2011; Baalousha *et al.*, 2015). La formation de sel ou d'une couche Ag_2S peut être influencée par la présence d'une couche de revêtement sur les AgNPs (Liu *et al.*, 2011; Baalousha *et al.*, 2015). En fonction des types de revêtement, la sulfatation peut être limitée et certaines propriétés des AgNPs natives conservées (Baalousha *et al.*, 2015). Les AgNPs peuvent sulfurer également plus rapidement que l'Ag massif en raison de leurs structures dominées par des bords et de leur grande surface d'exposition.

Dans l'eau, les AgNPs sont soumises à l'agrégation et à la dissolution. Plusieurs études ont montré que l'agrégation des nanoparticules est influencée par la force ionique du milieu (Fig. I-20). Les nanoparticules formeront donc des agrégats plus gros et plus rapidement dans l'eau de mer que dans l'eau de rivière. La dissolution s'effectue par une oxydation de la surface des nanoparticules pour libérer les ions Ag^+ . Dans l'eau déionisée ou l'EPPI (eau pour préparations injectables), les interactions des nanoparticules entre elles et avec le milieu sont limitées puisque cette eau est presque entièrement dépourvue d'ions et de matière organique. Au contraire, dans les eaux riches en chlorures, comme l'eau de mer, l'interaction de l'argent avec les ions chlorures vient compliquer le devenir des AgNPs. L'argent dissous peut former des chlorures d'argent AgCl insolubles et des complexes anioniques $\text{AgCl}_x^{(x-1)}$ (Levard *et al.*, 2012). Ces ions AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} et AgCl_4^{3-} peuvent demeurer dans la solution et interagir avec les différentes composantes du milieu marin (Levard *et al.*, 2013).

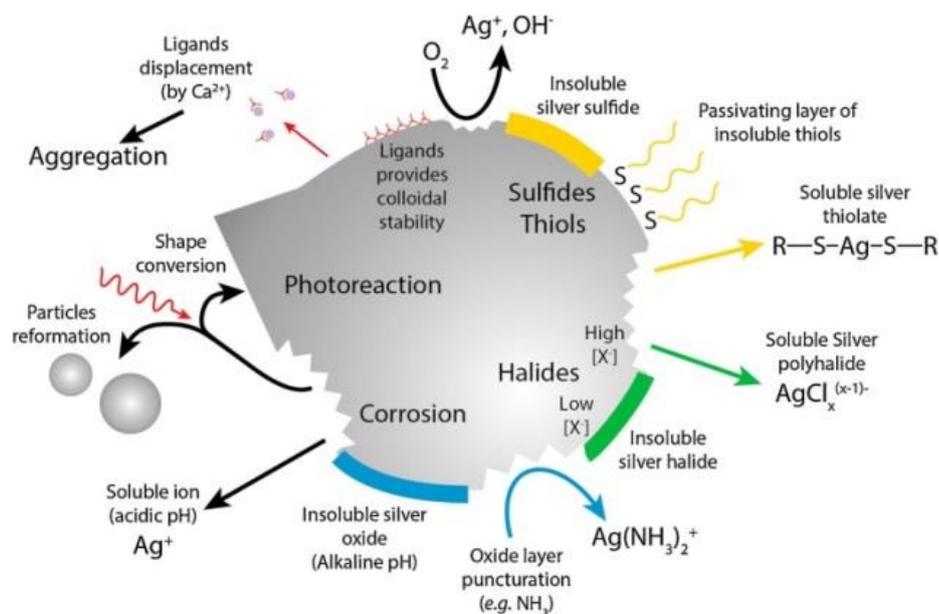


Figure I-20: Résumé schématique des phénomènes affectant la dissolution des AgNPs dans l'eau (Le Ouay and Stellacci, 2015).

Comme évoqué précédemment dans cette section, les AgNPs présentent une activité biocide à large spectre, due au relargage progressif et contrôlé d'ions Ag^+ , mais aussi une efficacité propre par leur interaction directe avec les cellules. Le tableau I-3 récapitule les modes d'action des AgNPs et des ions Ag^+ au niveau de la membrane et du cytoplasme cellulaire.

Les AgNPs présentent une efficacité propre, due à leurs spécificités physiques (taille, forme) et chimiques (réactivité de surface). Elles provoquent des modifications structurelles et fonctionnelles des parois et des membranes cellulaires. En pénétrant à l'intérieur de la cellule, elles peuvent entraîner des dommages irréversibles et perturber les différentes fonctions cellulaires. Les AgNPs peuvent également relarguer des Ag^+ qui constituent également un agent antimicrobien efficace vis-à-vis d'un large spectre de microorganismes, en raison de son action simultanée en différents sites cellulaires. Ces ions attaquent simultanément de multiples sites dans la cellule (ADN, ARN, protéines, enzymes, chaîne respiratoire, mitochondries), conduisant ainsi à une inactivation irréversible des fonctions physiologiques essentielles, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

		Modes d'action des AgNPs		Références
		AgNPs	Ag ⁺	
Microorganismes (bactérie ou levures)	Membranes cellulaires	<ul style="list-style-type: none"> • Accumulation à la surface de la membrane cellulaire • Altérations de la structure pariétale (formation de « trou ») • Augmentation de la perméabilité membranaire • Libération des constituants cellulaire • Dérégulation des mécanismes de transport transmembranaire • Liaisons avec les protéines pariétales 	<ul style="list-style-type: none"> • Liaisons avec les membranes des cellules bactériennes • Destruction et altération de la membrane cytoplasmique • Augmentation de la perméabilité cellulaire • Inhibition de la respiration cellulaire (bactéries) • Libération des constituants cellulaires • Liaison avec les protéines pariétales • Perturbations du fonctionnement des protéines pariétales • Inhibition de la phosphomannose (levures) • Perturbations des mécanismes de transports transmembranaires (inhibition de la force protonotrice...) • Présence d'agglomérats 	(Morones <i>et al.</i> , 2005; Lok <i>et al.</i> , 2007; Despax <i>et al.</i> , 2011; Sotiriou <i>et al.</i> , 2011; Levard <i>et al.</i> , 2012; Vimbela <i>et al.</i> , 2017)
	Cytoplasme	<ul style="list-style-type: none"> • Interactions avec des composés phosphorés comme l'ADN • Blocage de la réplication cellulaire • Perturbations des fonctions cellulaires (la respiration cellulaire...) 	<ul style="list-style-type: none"> • Liaisons avec des protéines cellulaires • Diminution de la production d'énergie • Interactions avec de nombreux groupements des constituants cellulaires chargés négativement (acides aminés...) • Interactions avec les groupements thiols (-SH) • Perturbations des fonctions enzymatiques • Perturbation de la réplication cellulaire et arrêt de la multiplication cellulaire • Production d'espèces oxygénées réactives (ROS), stress oxydatif • Perturbations des mitochondries (levures) • Inhibition de la respiration cellulaire • Présence d'agglomérats 	(Fox and Modak, 1974; Liao <i>et al.</i> , 1997; Feng <i>et al.</i> , 2000; Ng <i>et al.</i> , 2004; Pierard <i>et al.</i> , 2004; Holt and Bard, 2005; Kaegi <i>et al.</i> , 2011; Lowry <i>et al.</i> , 2012; Colman <i>et al.</i> , 2013; Pugliara <i>et al.</i> , 2016)

Tableau I-3 : Récapitulatif des modes d'action des AgNPs et des ions Ag⁺ au niveau de la membrane et du cytoplasme cellulaire.

2.2 Propriétés optiques des AgNPs : résonance plasmonique

En plus de leurs propriétés antibactériennes, les matériaux nanocomposites composés d'AgNPs sont largement étudiés pour leurs propriétés optiques exceptionnelles. La réduction de la taille d'un objet métallique à une échelle nanométrique conduit à des modifications importantes de sa réponse dans le domaine optique, comparée aux réponses émises dans son état massif. En effet, les AgNPs sont connues pour être le support d'une résonance plasmonique aiguë dans le domaine du visible. Grâce à la spectroscopie Raman et au phénomène d'exaltation dit « de surface », cette technique permet d'obtenir des informations très riches sur la structure moléculaire à température ambiante de molécules adsorbées à la surface d'un substrat plasmonique. Cet effet également appelé effet SERS (pour Surface Enhanced Raman Scattering) permet en outre l'exaltation des signaux optiques émis par des molécules localisées au voisinage des AgNPs. Cette amplification du signal permet alors d'augmenter très significativement la sensibilité de détection de molécules localisées au voisinage des AgNPs. Découvert en 1974, avec l'utilisation de molécules de pyridine adsorbées sur des surfaces d'argent brut, l'effet SERS a reçu ces dernières décennies un intérêt considérable en tant que technique d'analyse moléculaire puissante tout en offrant la possibilité d'une détection ultrasensible de biomolécules (Fleischmann *et al.*, 1974). Cependant, l'acquisition d'un signal SERS impose un contrôle précis à l'échelle nanométrique de la taille, de la forme des AgNPs ainsi que la distance les séparant entre elles et avec les molécules sondées. En général, l'amélioration de la section transversale de diffusion pour les substrats plasmoniques est attribuée à la fois au mécanisme électromagnétique basé sur la "résonance plasmonique" et au mécanisme basé sur "le transfert de charge".

Pour bien distinguer les deux mécanismes proposés ou bien pour protéger les AgNPs et ainsi rendre les substrats plasmoniques réutilisables, la recherche actuelle dans ce domaine s'oriente vers le développement de substrats plasmoniques dans lequel un plan d'AgNPs est enterré dans une matrice diélectrique à une distance donnée de la surface. L'épaisseur de la couche de couverture des AgNPs doit être choisie à l'échelle nanométrique. Ce paramètre très important est un compromis entre la préservation du signal SERS qui est optimal sur quelques nanomètres de la surface des AgNPs et la protection des AgNPs contre une oxydation rapide (Benzo *et al.*, 2013). L'élaboration des substrats nanostructurés plasmoniques est donc une étape cruciale dans l'application de cette méthode de caractérisation. Il existe plusieurs méthodes, avec différents degrés d'efficacité, d'élaboration des substrats plasmoniques basée sur une couche de SiO₂ contenant des AgNPs. Les voies qui ont été explorées sont soit via des

réactions chimiques, par fabrication lithographique, en utilisant une méthode de croissance (Stewart *et al.*, 2008 ; Rycenga *et al.*, 2011), par évaporation thermique (Lacy *et al.*, 1996) ou encore plus récemment en utilisant l'implantation d'ions à basse énergie (Carles *et al.*, 2009) et par procédés plasmas (Pugliara *et al.*, 2015).

Dans cette thèse, les substrats plasmoniques ont été élaborés par un procédé plasma : pulvérisation cathodique d'une cible d'argent suivie de polymérisation plasma. La méthode de dépôt et les paramètres optimaux pour élaborer des substrats plasmoniques de grandes efficacités ont été développées au LAPLACE dans le cadre de travaux antérieurs (Pugliara *et al.*, 2015; Pugliara *et al.*, 2016). Cependant, l'analyse ci-après sur les plasmas et les procédés de dépôt de couches minces par voie plasma sera orientée vers les propriétés et les spécificités du plasma utilisé pour l'élaboration de couches minces nanocomposites contenant des AgNPs dans le but d'exploiter la multifonctionnalité des AgNPs.

3. Elaboration par voie plasma de couches minces nanocomposites à base de SiO₂ contenant des AgNPs

La formation d'un dépôt à la surface d'un matériau peut être réalisée selon divers procédés. Par exemple, les procédés par voie humide sont fréquemment employés et très communs. Ces techniques permettent d'obtenir des couches relativement épaisses, de l'ordre de la centaine de micromètres. Cependant, ces dépôts ne sont pas compatibles avec des domaines d'application nécessitant un contrôle à l'échelle nanométrique tels que la microélectronique ou encore le domaine biomédical. Pour pallier cette demande, d'autres procédés comme les procédés plasma ont été développés pour le dépôt de couches minces et sont actuellement largement appliqués dans l'industrie (Lieberman and Lichtenberg, 2005). Un procédé plasma a été également utilisé dans le cadre de cette thèse. On distingue le dépôt physique en phase vapeur (PVD pour Physical Vapor Deposition) qui correspond à une évaporation ou une pulvérisation de la matière à partir d'une cible ou bien, le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD pour Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) à partir de précurseurs gazeux. De nos jours, les procédés plasma sont très répandus et ils permettent la modification et le dépôt en couches minces sur la surface d'un large panel de substrats. Ils offrent une excellente maîtrise de la croissance des couches minces, une grande versatilité et sont également respectueux de l'environnement. L'épaisseur des dépôts est comprise dans une large gamme allant du nanomètre au micromètre (Garcia and Goto, 2003; Lieberman and Lichtenberg, 2005; Lukaszewicz, 2011). Suivant l'utilisation de diverses

sources plasma (microonde, radiofréquence (RF), décharge à barrière diélectrique (DBD), etc.) il est possible de réaliser des dépôts à basse pression ou à la pression atmosphérique. Après une courte présentation des plasmas et de leurs caractéristiques principales dans la section suivante, nous nous attarderons plus précisément sur le procédé plasma qui permet de produire des couches minces de silice d'une épaisseur nanométrique contenant des AgNPs.

3.1 Généralités sur les plasmas : phénomènes et grandeurs physiques

Le plasma est considéré comme le quatrième état de la matière, avec les états solides, liquide et gazeux. Il constitue 99 % de l'univers (étoiles, milieu interstellaire...). C'est un milieu ionisé conducteur contenant des espèces chargées (ions mono- ou polyatomiques, et électrons) et des particules neutres (atomes, molécules et radicaux libres à l'état fondamental ou dans un état excité) libres de se mouvoir dans toutes les directions de l'espace. Pour distinguer le plasma d'un gaz classique on définit *le degré d'ionisation* :

$$\alpha_i = \frac{n_i}{n_i + N}, \quad (I.1)$$

où N représente la densité d'espèces neutres et n_i la densité d'ions. Les propriétés du plasma dépendent du gaz utilisé (nature, débit, pression) ainsi que de l'apport de l'énergie électrique pour initier la décharge (tension appliquée, puissance, fréquence) qui déterminent les paramètres principaux du plasma : les énergies des espèces chargées et des neutres, et leurs concentrations. On peut diviser les plasmas en deux grandes catégories (Fig. I-21). La première concerne les plasmas dits « chauds » pour lesquels le gaz est totalement ionisé. Ils sont caractérisés par une densité des espèces élevée, une température très élevée (plusieurs dizaines de millions de degrés) et identique pour les électrons et les ions. Comme exemple de plasma chaud on peut citer les étoiles, notamment le soleil et la fusion thermonucléaire.

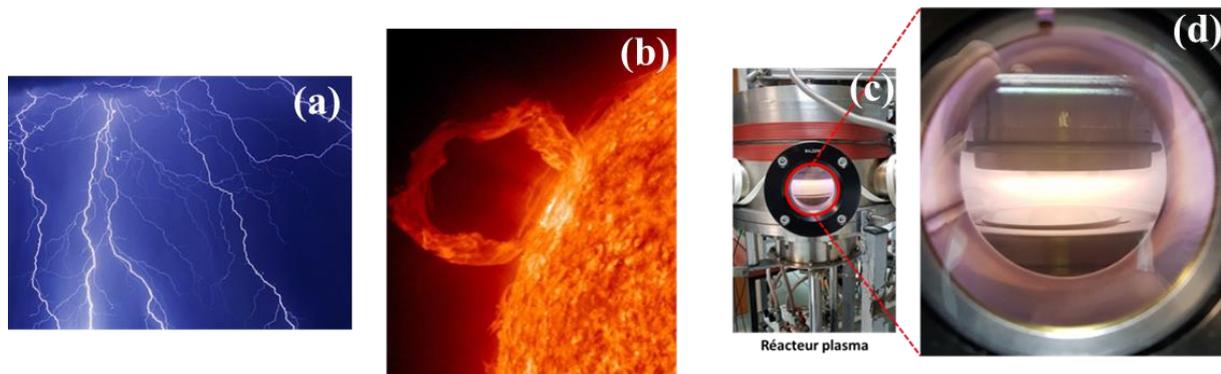


Figure I-21 : Image de plusieurs plasmas naturels (a et b) et d'un plasma créé artificiellement en laboratoire (c et d)

Par opposition, les plasmas dits « froids » possèdent un faible taux d'ionisation et des températures des espèces (ions, électrons, neutres) largement inférieures ; néanmoins avec une température des électrons largement supérieure ($T_e = 1 - 10$ eV) à celle des espèces lourdes : atomes, molécules, ions (de l'ordre de $T_g = T_i = 300 - 1000$ K). À cause de la faible vitesse thermique des électrons comparée à leur vitesse due au champ électrique de la charge d'espace, on appelle ces plasmas des plasmas froids. Les plasmas de laboratoire sont des plasmas froids. C'est ce type de plasma et en particulier un plasma RF capacitif ($\alpha_i \leq 10^{-4}$) entretenu à basse pression du gaz (environ 10 Pa), qui a été utilisé dans les procédés plasma pour le dépôt en couches minces dans cette thèse. Il fera objet de notre discussion par la suite pour introduire les grandeurs physiques et les processus se produisant dans un plasma.

L'amorçage d'une décharge électrique dans un gaz à basse pression entre deux plaques conductrices requiert un champ électrique supérieur à la rigidité électrique du milieu. Pour cela, on applique une tension supérieure à la tension d'amorçage V_b dépendant de la pression p et de la nature des gaz ainsi que de la distance inter-électrodes d . Cette tension d'amorçage est définie selon la loi de Paschen ($V_b = f(p \times d)$) (Lieberman and Lichtenberg, 2005). Lorsque le champ appliqué est suffisamment élevé, certains électrons acquièrent une énergie permettant d'ioniser les molécules et les atomes du gaz. Au cours de leur déplacement, les électrons créés génèrent de nouveaux électrons qui seront susceptibles d'ioniser à leur tour le gaz. Ce phénomène de multiplication des charges permet l'auto-entretien de la décharge (Pointu *et al.*, 1998; Lieberman and Lichtenberg, 2005). Le milieu plasma est ainsi constitué d'espèces chargées (électrons et ions) et neutres (atomes, molécules). Les électrons sont les espèces les plus légères et par conséquent, les plus mobiles. Leur énergie moyenne (ou température) est très supérieure à celle des ions ($T_e \gg T_i$). Pour une décharge RF capacitive, la température électronique est d'environ 2 – 3 eV, lorsque la température des espèces lourdes reste celle de la température ambiante ou légèrement supérieure. Étant à l'origine du transfert d'énergie aux espèces lourdes (atomes, molécules), les électrons permettent l'excitation, la dissociation et l'ionisation du milieu gazeux. De ce fait, dans le plasma on retrouve des ions positifs ou négatifs ainsi que des radicaux. Enfin, des photons sont émis dans le milieu plasma lors de la désexcitation d'une espèce excitée. Aux espèces présentées précédemment sont associés un certain nombre de phénomènes et de grandeurs physiques dont les principales caractéristiques sont décrites ci-dessous.

La *densité d'une espèce* présente dans le plasma est définie par le nombre moyen de particules contenues par unité de volume du plasma. Les espèces quantifiables sont les électrons n_e , les ions positifs n_i^+ et négatifs n_i^- , les neutres n_0 , les radicaux n_r et les états excités. Le plasma

est un milieu macroscopiquement neutre. La densité des électrons n_e est donc quasi-identique à la densité des ions positifs n_i^+ . En présence d'ions négatifs dans le plasma la condition de quasi-neutralité prend la forme de $n_e + n_i^- = n_i^+$.

Le plasma est un milieu à comportement collectif. Si une perturbation électrique locale apparaît dans un plasma, celui-ci va tendre à revenir vers l'état d'équilibre de neutralité. Cependant, le mouvement des espèces adopte, en général, un comportement collectif sous la forme d'une oscillation autour de son état d'équilibre. Le comportement collectif des électrons fait apparaître localement un mouvement oscillatoire dont la pulsation est appelée *fréquence du plasma*. Elle est donnée par l'expression suivante :

$$\omega_{pe} = \sqrt{\frac{n_{e0} e^2}{m_e \varepsilon_0}}, \quad (I.2)$$

avec n_{e0} qui correspond à la densité des électrons du plasma non perturbé, m est leurs masses, e est la charge élémentaire et ε_0 est à la permittivité du vide. De la même manière, on peut définir la fréquence d'oscillation des ions du plasma ω_{pi} selon la relation suivante :

$$\omega_{pi} = \sqrt{\frac{n_i e^2}{m_i \varepsilon_0}}, \quad (I.3)$$

avec n_i et m_i qui correspondent à la densité et à la masse des ions, respectivement.

La fréquence du plasma est une grandeur fondamentale composant les caractéristiques du plasma. Sa valeur affecte la capacité des espèces chargées (électrons et ions) à suivre ou non la variation périodique du champ électrique appliqué. Par conséquent, si la fréquence du champ électrique est supérieure à la valeur de la fréquence d'oscillation d'une espèce chargée (en l'occurrence les ions plus lents), cette espèce ne pourra pas suivre les oscillations du champ électrique. Dans le cadre de cette thèse, la fréquence d'exploitation du système utilisé est de 13.56 MHz. Dans un tel plasma RF capacitif, l'oscillation propre des électrons est d'une fréquence d'environ 300 MHz, mais les ions, de plus faibles mobilités ne peuvent pas suivre la fréquence du champ électrique. En effet, parce que $m_i \gg m_e$, la fréquence des ions du plasma est beaucoup plus basse (d'environ 1 MHz) que celle des électrons. Ainsi, dans une décharge RF, les ions restent pratiquement immobiles et ne subissent que la valeur moyenne du champ électrique oscillant.

Pour les procédés de dépôt de couches minces, les plasmas sont créés et maintenus dans des enceintes appelées réacteurs plasma. Il s'agit de chambres aux géométries plus ou moins complexes dans lesquelles les gaz sont injectés pour établir une pression donnée, qui disposent d'un système de génération des plasmas (électrodes, antennes, etc.) et d'un ou plusieurs porte-

substrat. Les parois du réacteur délimitent alors les dimensions du plasma. Les espèces chargées produites dans la décharge sont perdues dans le volume ou sur les parois.

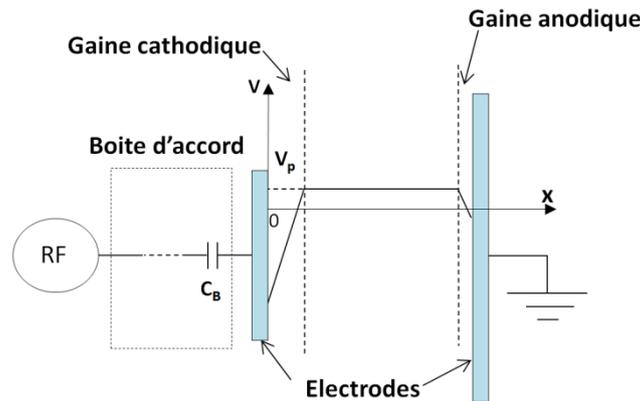


Figure I-22 : Evolution spatiale du potentiel du plasma dans l'espace inter-électrode (Pugliara, 2016).

Dans une décharge RF capacitive, l'oscillation des charges entre les deux électrodes provoque une évolution spatiale du potentiel dans l'espace inter-électrodes (Fig. I-22). Cet espace se divise en trois parties : le plasma et les deux *gaines électrostatiques*. Dans les gaines, il y a une chute du potentiel et on observe une rupture de la neutralité électrique. Dans la région plasma (où la quasi-neutralité est maintenue) le potentiel est quasi-constant et est dit potentiel plasma (V_p).

Dans une décharge RF capacitive avec une asymétrie entre les deux électrodes, telle que celle utilisée dans ce travail (Fig. I-22), le rapport entre les potentiels, l'un situé au niveau de la gaine de la petite électrode V_{g1} et celui de la gaine de la grande électrode V_{g2} , varie selon le rapport inverse des aires des électrodes (A_1 et A_2) à la puissance m :

$$\frac{V_{g1}}{V_{g2}} = \left(\frac{A_2}{A_1}\right)^m . \quad (\text{I.4})$$

Expérimentalement pour des décharges entretenues à de basses pressions du gaz, m est mesuré entre 1.5 et 2 (Pointu *et al.*, 1997). Cette relation sur l'aire des électrodes est à l'origine d'une *autopolarisation continue de l'électrode* sur laquelle on applique le champ radiofréquence par rapport à la masse (petite électrode). L'asymétrie entre les deux électrodes conduit à $V_{g1} \neq V_{g2}$. Si $A_1 < A_2$ (à l'aire de l'électrode à la masse se rajoute l'aire des parois du réacteur qui d'habitude sont faites d'inox et également reliées à la masse), le potentiel d'autopolarisation (V_{dc}) au niveau de la petite électrode est donc globalement négatif. De plus, la présence d'une capacité de blocage dans la boite d'accord (Fig. I-22) favorise cette polarisation spontanée (Bergmann, 2014). Pour une géométrie de réacteur donnée, le potentiel d'autopolarisation peut atteindre des niveaux très élevés (centaines de volts) en fonction de la puissance injectée dans

le plasma. Il est à l'origine de l'accélération des ions positifs du plasma vers la petite électrode et permet la pulvérisation de cette dernière. La pulvérisation consiste à éjecter des atomes de la surface d'un matériau solide (la cible) par le bombardement d'ions provenant du plasma. Dans le cas d'une décharge RF entretenue dans l'argon à basse pression et d'une cible d'argent (Ag), des atomes Ag sont éjectés à la suite du bombardement de la cible par des ions incidents d'Ar⁺. Cependant pour que le mécanisme de pulvérisation soit effectif, l'ion incident doit acquérir une énergie minimale E_s répondant à l'expression suivante :

$$E_s = \frac{2U_0}{\gamma(1-\gamma)}, \quad (I.5)$$

où U_0 est l'énergie de sublimation de l'élément (entre 1 et 10 eV/atome) et γ est le rapport des masses des deux espèces (l'ion Ar⁺ et l'atome d'Ag). A basse pression, les gaines électrostatiques sont non collisionnelles. Les ions acquièrent donc une énergie E fixée par la valeur du potentiel d'autopolarisation. L'efficacité de la pulvérisation est fonction du V_{dc} .

3.2 Utilisation de la pulvérisation pour la formation des AgNPs

Dans un procédé plasma, le contrôle fin des paramètres du plasma permet de contrôler les propriétés des couches minces réalisées. Ainsi dans une décharge RF capacitive asymétrique entretenue à basse pression du gaz dans l'argon on peut obtenir un monoplan d'AgNPs déposé sur un substrat (Makasheva *et al.*, 2013) (Fig. I-23). Cette configuration a été élaborée pour analyser le transport des charges au travers d'une couche nanocomposite et appliquée à l'élaboration de substrats plasmoniques (Pugliara *et al.*, 2015; Pugliara *et al.*, 2016).

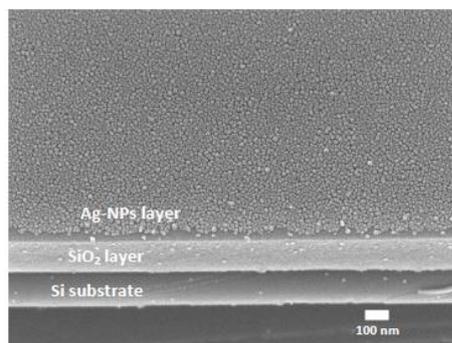


Figure I-23 : Image MEB d'une unique couche d'AgNPs déposée sur une couche de SiO₂ sur un substrat de Si. Observation inclinée à 30°. Densité des AgNPs de $3.6 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ et taille moyenne de 20 nm (Makasheva *et al.*, 2013).

Dans le dispositif du plasma, il est trivial d'imposer une puissance précise avec le générateur RF. Cependant, l'estimation de l'énergie transmise au plasma se complexifie à cause des pertes en lignes et de l'utilisation de la boîte d'accord d'impédance. En outre, dans une décharge RF à couplage capacitif, il est plus rigoureux de décrire la puissance transmise avec le potentiel d'autopolarisation. En effet, le courant de conduction issu du plasma étant nul, l'augmentation de la puissance intensifie également le potentiel d'autopolarisation (Lieberman and Lichtenberg, 2005). Les ions du plasma vont alors acquérir une plus haute énergie ce qui va permettre aux atomes pulvérisés d'acquérir une énergie cinétique plus élevée. Par conséquent, la cinétique de croissance des cristaux d'argent sur le substrat sera améliorée ce qui confère une plus grande taille aux AgNPs (Fig. I-24 a et b). Une autre conséquence de l'augmentation de la puissance se manifeste dans l'énergie moyenne d'électrons du plasma qui bombardent le substrat. Ils apportent ainsi une énergie supplémentaire aux particules d'argent en croissance à la surface. La migration des particules, et donc leur cinétique de croissance est favorisée. En conséquence, pour le même temps de pulvérisation les particules formées ont une taille plus grande. Pour des temps courts de pulvérisation la distribution en taille est Gaussienne (Pugliara *et al.*, 2015).

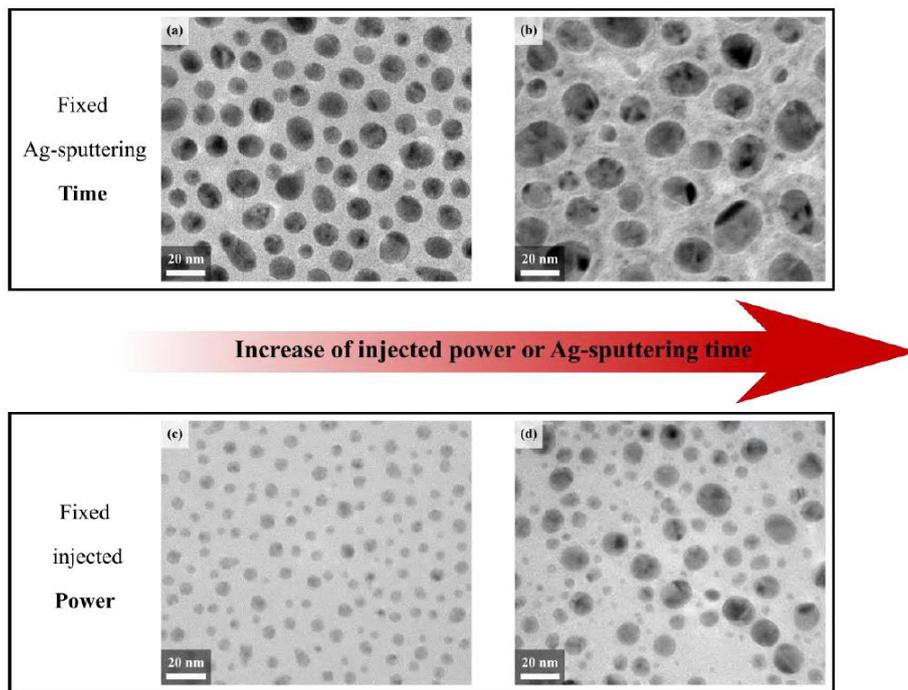


Figure I-24 : Images MET en champ clair d'une vue plane des substrats nanocomposites obtenus avec 2 puissances (a) 40W et (b) 80W et un temps de pulvérisation fixé $t_s = 5$ s, et pour 2 temps (c) 10 s et (d) 30 s et une puissance injectée fixée $P = 10$ W (Pugliara *et al.*, 2015).

Si maintenant on fixe la puissance injectée dans le plasma, *i.e.* on maintient le même potentiel d'autopolarisation, le temps de pulvérisation sera le deuxième facteur influençant la taille des AgNPs (Fig. I- 24 c et d). Dans ce cas des processus de surface, tels que la diffusion et la maturation d'Ostwald, commencent à jouer un rôle important dans la formation des AgNPs. Le résultat de ces mécanismes complémentaires est une distribution en taille des AgNPs plus importante avec tendance à obtenir une population plus importante d'AgNPs de grande taille (Pugliara, 2016).

Dans le milieu plasma RF, la présence d'atomes neutres d'argon peut perturber le trajet des atomes d'argent pulvérisés. La pression d'argon appliquée peut faire subir aux atomes d'argent pendant leur transport un nombre de collisions plus ou moins important. L'énergie des atomes pulvérisés sera ainsi diminuée par cette succession de chocs et leur trajectoire peut être également modifiée. La croissance des AgNPs est ainsi diminuée. Si l'on augmente la pression du gaz dans le système et donc la densité d'atomes d'argon dans le milieu, on obtiendra l'augmentation de l'ionisation puis une augmentation de la pulvérisation d'argent. Ainsi, un compromis existe par rapport à la pression d'argon selon lequel on favorise d'un côté la quantité d'atomes pulvérisés et de l'autre la réduction de la croissance cristalline sur le substrat.

3.3 Elaboration des couches minces de SiO₂ par procédé plasma

Les films minces de SiO₂ sont utilisés dans de nombreuses applications dans différents domaines (comme l'optique, la microélectronique, la conception de revêtement anticorrosion, etc.) et on observe un intérêt croissant pour ces films. Parmi les différentes techniques de dépôt, la méthode PECVD est devenue l'une des méthodes de dépôt de couches minces la plus importante et notamment grâce à la possibilité de préparer des revêtements de bonne qualité tout en appliquant une température faible pour le substrat. Les couches minces de SiO₂ de haute qualité sont élaborées par des procédés plasma à partir des précurseurs du silicium (Si) comme le silane (SiH₄), le tétraéthoxysilane (TEOS) ou l'hexaméthylidisiloxane (HMDSO, Si₂OC₆H₁₈) qui sont les plus utilisés. Dans ce procédé, on utilise également un gaz noble (hélium ou argon) qui est mélangé à des molécules d'oxygène (O₂) ou de protoxyde d'azote (N₂O). Le TEOS et l'HMDSO sont tous les deux non toxiques, non explosifs et beaucoup plus sûrs que le silane. Cependant, le fait que l'HMDSO possède une pression de vapeur plus élevée à la température ambiante facilite son utilisation (Despax et Raynaud, 2007). De plus, l'HMDSO est peu coûteux, chimiquement stable et permet d'atteindre des vitesses de dépôt plus élevées qu'avec d'autres monomères siliciés (Benítez *et al.*, 2000). La structure moléculaire de l'HMDSO est présentée dans la Fig. I-25.

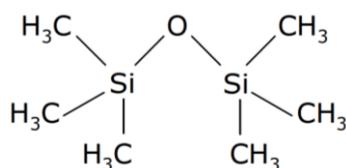


Figure I-25 : Structure moléculaire de l'hexaméthylsiloxane (HDMSO, $C_6H_{18}OSi_2$).

Les premiers travaux sur la formation d'une matrice organosiliciée formée par procédé plasma ont débuté au début des années 70 avec *Vasile* et *Smolinsky* qui ont travaillé avec le vinyltriméthylsilane et l'HDMSO comme précurseurs (*Vasile and Smolinsky, 1972*). Leurs analyses sur la composition chimique des couches minces déposées en spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier (FTIR) ont montré que le précurseur HDMSO donne une couche mince de polymère organosilicié de type $SiO_xC_yH_z$. De plus, avec l'ajout d'oxygène par exemple, il est possible d'augmenter la dureté et le caractère hydrophile des dépôts, qui présentent alors une composition similaire à celle du verre (« silica-like ») (*Prasad et al., 2005; Hegemann et al., 1999; Aumaille et al., 2000; Goujon et al., 2004*). Selon les conditions expérimentales (puissance injectée dans le plasma, pressions partielles de précurseurs et du gaz vecteur, température du substrat, etc.), il est possible d'élaborer des couches de polymères organosiliciés de type $SiO_xC_yH_z$ où x, y, z peuvent prendre des valeurs différentes en fonction des paramètres expérimentaux ou des couches minces de silice très proches de la composition à la silice thermique - SiO_2 (*Makasheva et al., 2016*).

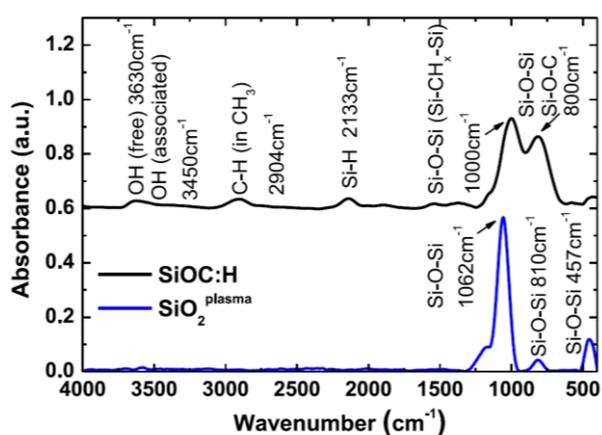


Figure I-26: Spectres FTIR de couches minces organosiliciée et silice, élaborées par plasma à partir d'HDMSO pour la première et d'un mélange HDMSO et O_2 pour la SiO_2 au LAPLACE (*Makasheva et al., 2016*).

La spectroscopie FTIR en transmission est régulièrement utilisée pour effectuer des analyses de la composition chimique des couches réalisées par procédés plasma. La Fig. I-26

présente des spectres FTIR de deux couches minces élaborées par procédé plasma à partir d'HMDSO : une couche organosiliciée SiOC:H et une couche de silice plasma SiO₂. On peut voir sur le spectre FTIR que la couche SiO₂ plasma possède les caractéristiques d'une silice thermique. On observe les trois modes optiques transverses (TO) typiques des vibrations moléculaires de silice amorphe : mode de balancement de Si-O-Si à 457 cm⁻¹, d'étirement symétrique à 810 cm⁻¹ et d'étirement asymétrique à 1062 cm⁻¹. L'épaule centré à 1250 cm⁻¹ est aussi bien visible sur le spectre. En revanche, la couche organosiliciée SiOC:H est beaucoup moins organisée, présentant deux grands massifs autour de 800 cm⁻¹ et 1000 cm⁻¹. La grande largeur des bandes témoigne d'une structure amorphe. La forte puissance utilisée pour entretenir la décharge conduit à une très forte dissociation de l'HMDSO. En conséquence, le mode asymétrique de Si-H à 2133 cm⁻¹ apparaît dans le spectre de la couche organosiliciée SiOC:H. Cette vibration est aussi intense que le mode d'étirement asymétrique à 2904 cm⁻¹ de la vibration C-H dans l'environnement de CH₃. La comparaison des deux spectres montre bien l'efficacité du procédé plasma pour l'élaboration de couches minces de silice SiO₂ à partir d'HMDSO en saturant le mélange avec l'O₂. C'est cette méthode de dépôt de couches minces de silices plasma qui a été utilisée dans le cadre de cette thèse.

3.4 Elaboration des couches minces nanocomposites de SiO₂ contenant des AgNPs

Le dépôt des couches minces nanocomposites contenant des nanoparticules métalliques par procédé plasma peut s'effectuer dans le même réacteur à l'aide d'un plasma RF asymétrique axial à couplage capacitif entretenu dans l'argon à basse pression du gaz, en combinant la pulvérisation des atomes provenant d'une cible métallique suite au bombardement des ions d'Ar⁺ (PVD) et la polymérisation par plasma des précurseurs injectés dans le plasma pour former la matrice hôte (PECVD). Le type de réacteur plasma RF capacitif asymétrique qui a été utilisé pour élaborer les différents nanocomposites dans cette thèse a été développé dans les années 80 par Kay *et al.*, puis le procédé a été amélioré par Despax *et al.* en 2007 (Kay and Hecq, 1984; Despax and Raynaud, 2007). Cette méthode, utilisée également par d'autres groupes (Kay and Hecq, 1984; Perrin *et al.*, 1985; Despax and Flouttard, 1989; Laurent and Kay, 1989; Despax and Raynaud, 2007; Körner *et al.*, 2009; Dilonardo *et al.*, 2010; Kylián *et al.*, 2013; Drábik *et al.*, 2015; Pugliara *et al.*, 2015; Makasheva *et al.*, 2016) de recherche offre différents avantages : (i) un contrôle fin du contenu métallique dans la couche par le contrôle des pressions partielles des précurseurs injectés dans le plasma ce qui permet d'obtenir des concentrations

des nanoparticules métalliques allant de quelques pourcents jusqu'à 100 %, (ii) une dispersion homogène des nanoparticules dans la matrice et (iii) un contrôle fin de la taille des nanoparticules. Plusieurs types de couches nanocomposites ont été élaborés en fonction du précurseur et de la cible métallique utilisés, par exemple des nanoparticules d'or dans des matrices fluorocarbonées ou carbonées (Perrin *et al.*, 1985; Despax and Flouttard, 1989; Laurent and Kay, 1989), des nanoparticules de platine dans des matrices carbonées ou encore des AgNPs dans des matrices organosiliciées ou de type hydrocarbure oxygéné (Despax and Raynaud, 2007; Dilonardo *et al.*, 2010; Despax *et al.*, 2011; Kylián *et al.*, 2013; Drábik *et al.*, 2015).

Différentes architectures de couches nanocomposites peuvent être envisagées en fonction de l'application des deux modes de fonctionnement de ce type de procédé plasma : PVD et PECVD. L'utilisation simultanée de deux modes conduit au dépôt de couches nanocomposites avec des nanoparticules métalliques dispersées dans la matrice et l'altération de ces deux modes offre la possibilité d'obtenir des couches stratifiées. Cependant, le dépôt simultané des nanoparticules métalliques et des matrices diélectriques par ce procédé plasma est un processus délicat demandant une maîtrise fine des paramètres du plasma tout au long du temps du dépôt. À cause de la déposition de radicaux issus du précurseur sur toutes les parois du réacteur plasma, formant ainsi une matrice également sur la cible métallique, ce procédé plasma est accompagné par le phénomène d'empoisonnement de la cible. L'empoisonnement progressif de la cible fait diminuer le taux de pulvérisation des atomes métalliques, ce qui conduit à une diminution progressive de la taille et de la densité des nanoparticules en fonction de l'épaisseur de la couche (Fig. I-27). L'homogénéité de dispersion de nanoparticules dans la matrice est donc interrompue.

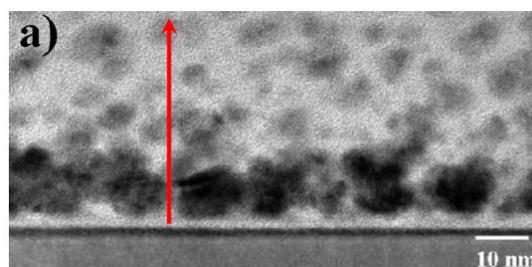


Figure I-27: Images MET en vue transversale des AgNPs enterrées dans une matrice amorphe d'hydrocarbure oxygénée (Körner *et al.*, 2010). La taille et la densité des AgNPs diminuent en fonction de l'épaisseur de la couche (voir la flèche rouge) à cause du phénomène d'empoisonnement de la cible métallique.

Pour remédier à ce problème, (Despax et Raynaud, 2007) ont proposé une injection pulsée du précurseur. Ce choix permet de contrôler le degré d'empoisonnement de la cible en

le fixant par le rapport cyclique du pulse de précurseur (le temps d'injection sur la période de pulse). L'image MET d'une couche mince organosiliciée contenant des AgNPs dispersées dans la matrice obtenue avec une injection pulsée d'HMDSO dans la décharge est montrée sur la Fig. I-28 (Despax *et al.*, 2011). On peut voir que suivant l'épaisseur de la couche composite (flèche rouge) la dispersion des AgNPs est homogène. La taille et la densité des AgNPs sont préservées du début à la fin du dépôt. Les AgNPs élaborées lors de cette étude possèdent une taille moyenne de 7 nm.

D'autres modifications de la couche composite peuvent également être introduites par le contrôle des propriétés plasma. La composition chimique de la matrice peut être influencée par la puissance RF appliquée dans le plasma. En effet, en augmentant la puissance RF, les groupements méthyles sont de plus en plus éliminés de la couche organosiliciée et une densification de la matrice due aux groupement aliphatiques C=C est observée (Despax and Raynaud, 2007). De même, l'augmentation de la densité des AgNPs dans la couche (fraction volumique $f_{Ag} > 0,3$) conduit à une augmentation de groupements Si-O-Si dans la matrice.

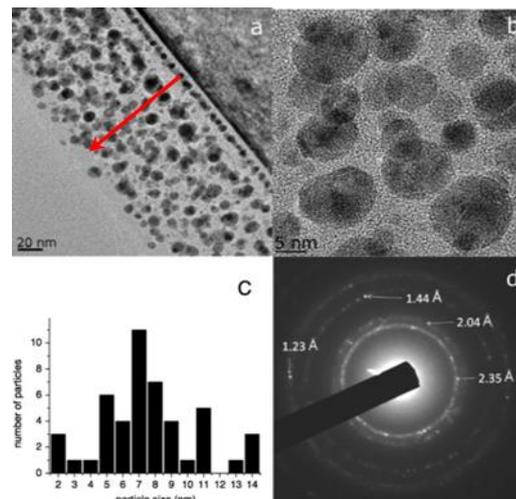


Figure I-28 : Images MET d'une couche mince organosiliciée contenant des AgNPs déposée sur un substrat de silicium ; (a) vue transversale; (b) image haute résolution qui permet de voir la cristallinité des AgNPs ; (c) histogramme de la taille des AgNPs (fraction volumique = 0,39) ; (d) image associée de microdiffraction électronique (Despax *et al.*, 2011).

L'altération de ces deux modes de dépôt : PVD suivie d'une PECVD offre la possibilité d'obtenir des couches stratifiées. Le dépôt successif a été utilisé par Pugliara *et al.* pour élaborer des couches minces nanocomposites composées d'un plan d'AgNPs déposé sur une couche de SiO₂ et recouvert par une couche mince de SiO₂ (Pugliara *et al.*, 2015). Cette architecture a été adaptée pour optimiser les propriétés optiques des substrats plasmoniques. De nouveau, la variation des propriétés plasma permet de faire varier les paramètres des AgNPs (taille et

densité). L'augmentation de la puissance injectée dans le plasma (de 40W à 80W) permet l'augmentation de la taille des AgNPs de 11.1 ± 2.4 nm à 19.6 ± 7.8 nm. La couche de silice plasma dans laquelle les AgNPs sont enterrées possède une composition proche à la silice thermique. La Fig. I-29 montre une image MET en champ clair en coupe transversale d'un échantillon élaboré par cette méthode. L'observation en MEHR (mode haute résolution) qui correspond à l'image en insert de la Fig. I-29 montre que les AgNPs sont cristallines et constituées d'argent pur. La structure complète de la couche élaborée possède des propriétés anti-réfléctives pour une épaisseur totale de 105 nm. En effet, cette méthode d'élaboration par voie plasma des couches nanocomposites contenant les AgNPs permet d'optimiser les différents paramètres afin d'obtenir de substrats plasmoniques efficaces, possédant une grande surface. Cette efficacité des substrats plasmoniques a été démontrée par réflectométrie. La sensibilité des substrats plasmoniques est telle qu'une modification de 25 % en moyenne de la réflectivité a été enregistrée autour de 500 nm (Pugliara *et al.*, 2015).

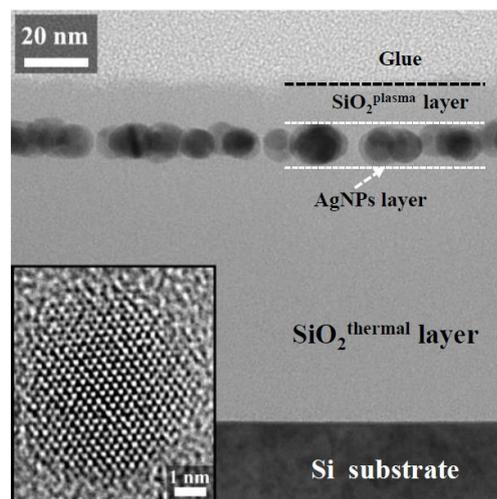


Figure I-29 : Image MET en champ clair en section transversale d'un échantillon élaboré par pulvérisation d'argent suivie par PECVD. Conditions : $t_s = 5$ s, $P = 40$ W ($V_{dc} = -750$ V). Le temps de dépôt du SiO_2 plasma est $t_d = 60$ s. En insert, image MEHR d'une AgNP (Taille des AgNPs = 11.1 ± 2.4 nm) (Pugliara *et al.*, 2015).

Suite à cette première étude, Pugliara *et al.*, 2016 ont étudié également la capacité des AgNPs enrobées dans une matrice de silice à relarguer des ions Ag^+ lorsque les couches nanocomposites sont immergées dans l'eau. En effet, la toxicité à court terme des AgNPs sur la photosynthèse des algues *Chlamydomonas reinhardtii* a été étudiée en utilisant la fluorométrie. Il a été démontré qu'en fonction de la structure utilisée on peut contrôler la quantité d'ions d'argent relargués dans la solution et ainsi contrôler la toxicité et/ou l'effet antimicrobien des AgNPs enterrées dans ce type de couches nanocomposites. De plus, dans ce travail Pugliara *et al.* ont confirmé que les substrats plasmoniques ainsi élaborés sont

réutilisables. Une seconde utilisation de la même couche nanocomposite offre la même quantité d'Ag⁺ relarguée. Différentes structures nanocomposites ont été élaborées par le même procédé plasma. Les images MET en vue transversale et en vue plane des différents échantillons sont présentées dans la figure I-30. Les AgNPs possèdent une taille moyenne de 7.9 nm pour l'échantillon E3 et 18.5 nm pour l'échantillon E4 (Fig. I-30). On peut également souligner la faible épaisseur de 5.6 nm et de 5.5 nm respectivement, que possède la couche de silice plasma recouvrant les AgNPs. Avec cette faible épaisseur, la couche de silice plasma formée suit de manière conforme les AgNPs (Fig. I-30). Ce dernier effet confirme la versatilité des procédés plasma pour le dépôt conforme à la structuration de la surface.

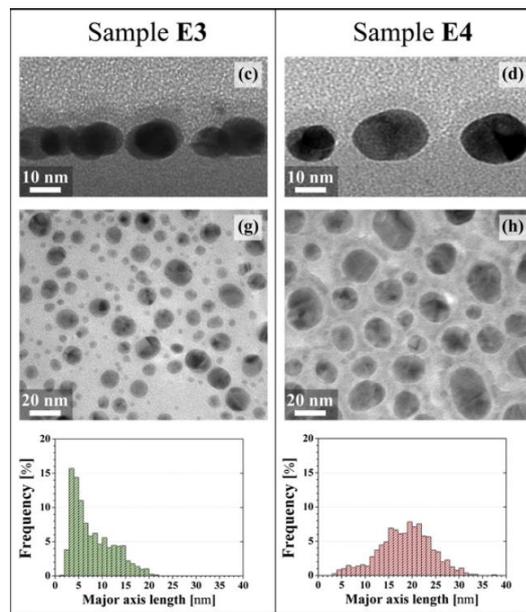


Figure I-30 : (c)-(d) Zoom MET-XS en vue transversale en champ clair sur la partie supérieure des couches nanocomposites et (g)-(h) images MET en vue plane des échantillons exploités pour la mesure de la libération d'argent et taille-distribution associée.

Les différentes structures présentées précédemment montrent bien la diversité structures nanocomposites que l'on peut obtenir en utilisant le procédé plasma. L'utilisation de la pulvérisation cathodique a permis d'obtenir des nanocomposites composés d'un plan d'AgNPs sur une couche mince de silice thermique (SiO₂th). Ce plan d'AgNPs peut ensuite être recouvert d'une couche mince organosiliciée déposée par procédé plasma. En faisant varier certains paramètres du procédé plasma comme par exemple la puissance injectée, il est alors possible de contrôler la taille, la densité des AgNPs ainsi que l'épaisseur de la couche mince recouvrant les AgNPs. Cette flexibilité a permis ainsi l'élaboration de différentes structurations de nanocomposites pour l'étude du transport de charge injecté, l'optimisation de substrats plasmoniques ou encore l'évaluation de la toxicité de ces substrats vis-à-vis des algues.

L'utilisation des AgNPs dans l'élaboration des nanocomposites permet ainsi de profiter de leurs multifonctionnalités, en conférant aux nanomatériaux différentes propriétés leur appartenant (optique, électrique ou activité antimicrobienne).

Problématique et objectifs de la thèse

Au cours des vingt dernières années, le développement, la production et l'application des nanomatériaux manufacturés a connu une augmentation rapide et considérable. Ces nanomatériaux jouent actuellement un rôle croissant dans le domaine industriel ou biomédical. Il est largement admis que l'émergence des matériaux à l'échelle nanométrique est due à leur grand rapport surface/volume et à leurs propriétés physiques exceptionnelles. Dans ce contexte, les AgNPs sont bien connues non seulement pour leurs propriétés optiques (plasmoniques) mais également pour leur réactivité chimique et biologique. Concernant leurs propriétés plasmoniques, les AgNPs sont la meilleure antenne pour amplifier des signaux électroniques et vibrationnels locaux à l'échelle nanométrique dans le domaine du visible. Elles permettent ainsi de fournir des informations moléculaires uniques en champ lointain. En effet, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) s'est révélée être une technique analytique puissante pour la spectroscopie moléculaire, caractérisée par une détection ultra-sensible, pouvant aller jusqu'à la molécule unique. Toutefois, son application demande l'utilisation de substrats plasmoniques de large rendement, ce qui reste un inconvénient majeur pour des applications potentielles. Pour pallier ce problème une voie efficace est l'élaboration de substrats plasmoniques performants par procédé plasma.

Les AgNPs montrent également une grande efficacité antimicrobienne contre les bactéries, les virus et d'autres micro-organismes eucaryotes. Dans le domaine biomédical, les applications les plus répandues des nanocomposites à base d'AgNPs concernent la constitution de revêtements antimicrobiens. L'adhésion et secondairement la formation de biofilms microbiens à la surface de matériaux d'intérêt provoquent de nombreux problèmes en santé humaine et animale et des pertes économiques considérables, dans les secteurs industriels et notamment dans l'industrie agro-alimentaire. La nécessité de lutter contre la colonisation des surfaces dans ces secteurs stratégiques justifie l'intérêt croissant pour les recherches dédiées à l'amélioration de leurs propriétés en termes d'hygiène. Les biofilms étant très difficiles à éradiquer une fois formés (perte de sensibilité), la stratégie préventive visant à inhiber l'adhésion des microorganismes et à éliminer ceux entrant en contact avec la surface constitue alors une approche pertinente et efficace.

Dans cette thèse nous nous sommes donc intéressés à l'étape initiale d'adhésion des cellules à la silice modifiée selon différentes modalités. Dans des conditions naturelles, la

surface des matériaux est souvent en contact avec les protéines du milieu environnant ou celles-ci vont venir s'adsorber naturellement. Cette couche de conditionnement ainsi formée peut moduler l'adhésion microbienne. Nous nous sommes donc intéressés au comportement de gouttelettes protéiques déposées à la surface de la silice thermique (SiO_2^{th}) qui peut s'apparenter aux cas de projections de fluides rencontrés notamment en secteur hospitalier, ainsi qu'à la présence d'une couche mince protéique de Sérum Albumine Bovine (SAB) ou de Fibronectine plasmatisée humaine (Fn) sur l'adhésion de la levure *C. albicans*. Nous nous sommes intéressés également aux nanocomposites contenant des AgNPs.

Parallèlement, l'utilisation de revêtements contenant un agent antibactérien comme les AgNPs afin d'inhiber le développement d'un biofilm sur une surface a été évaluée. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'influence des AgNPs sur l'adhésion de *C. albicans* lorsqu'elles sont enterrées à quelques nanomètres de la surface dans une couche de silice plasma ou lorsqu'elles sont exposées à la surface soit en contact direct avec les microorganismes.

Dans cette optique, un travail interdisciplinaire a été entrepris avec pour objectifs :

- 1) L'exploitation des propriétés plasmoniques de surface induite par les AgNPs intégrées dans des matrices diélectriques pour une amplification efficace de l'empreinte spectrale de protéines déposées à la surface des substrats plasmoniques.
- 2) L'identification du comportement des gouttelettes et des couches minces protéiques déposées sur une couche mince de SiO_2^{th} en lien avec des conditions naturelles de séchage.
- 3) La détermination par méthode hydrodynamique des propriétés antiadhésives ou pro-adhésives des couches nanocomposites à base d'AgNPs exposées à la surface ou enterrées dans une couche de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ à une distance contrôlée de quelques nanomètres de la surface vis-à-vis de *C. albicans*.
- 4) L'exploration du rôle d'une couche mince protéique (couche de conditionnement) sur l'adhésion/le détachement de *C. albicans*.

Pour répondre au premier objectif nous avons utilisé une protéine fluorescente la DsRed (*Discosoma Red fluorescent protein*). Pour répondre aux objectifs 2, 3 et 4, nous avons utilisé les protéines modèles SAB et Fn. Des gouttelettes de SAB ou de Fn ont donc été déposées à la surface d'une couche mince de SiO_2^{th} et leur déshydratation a été suivie et caractérisée au cours du temps. Les couches minces protéiques ont été créées à l'aide de la méthode d'enduction par trempage permettant d'obtenir une couche mince protéique homogène à la surface des différents nanocomposites testés.

Dans le cadre de cette thèse, le procédé plasma, basé sur une décharge radio-fréquence (RF) à couplage capacitif, a été utilisé pour créer des revêtements nanocomposites à base de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ et d'AgNPs. Les revêtements ont ainsi été synthétisés en deux étapes : la pulvérisation d'une cible d'Ar par bombardement ionique suivie de la polymérisation par PECVD d'HDMSO dans un mélange gazeux avec O_2 . Ce procédé plasma a été utilisé afin d'élaborer premièrement une monocouche d'AgNPs enterrées dans une couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ sur une couche mince de SiO_2^{th} sur un substrat de Si et deuxièmement un plan d'AgNPs recouvrant complètement une couche mince de SiO_2^{th} sur un substrat de Si. Cette structuration représente un substrat plasmonique nécessaire pour l'utilisation de l'effet SERS. L'espèce métallique choisie, l'argent, a alors été incorporée dans la matrice diélectrique polymérique du fait de sa multifonctionnalité.

Dans ce travail de thèse, la levure *C. albicans* a été choisie comme modèle d'étude eucaryote, en raison de sa capacité à adhérer fortement aux surfaces et de son identification en tant que source de contamination fongique de produits alimentaires et également de son implication dans le domaine biomédical dans de nombreuses infections nosocomiales. L'impact de différents nanocomposites sur l'adhésion de *C. albicans* a ensuite été quantifié *in vitro* en utilisant une méthode hydrodynamique. Cette méthode est basée sur l'observation *in situ* du détachement des microorganismes, préalablement adhérents aux différentes surfaces, grâce à l'utilisation d'une chambre à écoulement cisailé. Tout en contrôlant les conditions hydrodynamiques et physico-chimiques, ce type de dispositif a permis de réaliser une analyse fine du comportement bio-adhésif des différents nano composites. En effet, l'optimisation du dispositif a permis l'application de contraintes de cisaillement très faibles et l'étude de l'influence d'une couche mince protéique sur l'adhésion cellulaire de *C. albicans*. Les différents profils de détachement obtenus ont ainsi été corrélés aux caractéristiques topographiques et physico-chimiques des différents nanocomposites évalués avec l'utilisation de différentes techniques d'analyse de surface (MEB, élipsométrie, FTIR, méthode de la goutte posée).

Ce travail s'inscrit dans le cadre des projets ADAGIO (IDEX Transversalité de l'Université de Toulouse) et ADAGIO-APR2016 de l'Université de Toulouse et de la Région Occitanie.

Il a été réalisé en codirection entre le LAPLACE (Laboratoire plasma et conversion d'énergie) et le LGC (Laboratoire de Génie Chimique) et est à l'interface entre la science des matériaux et la microbiologie. L'étude portant spécifiquement sur la levure *C. albicans* a été réalisée au LGC, dans le Département BioSyM, dont un des thèmes de recherche affiché concerne l'adhésion microbienne et la formation de biofilms. La conception des nanomatériaux à base d'AgNPs et de silice élaborée par procédé plasma, et du support de contenance de la chambre

a écoulement cisailé a été effectuée au sein de l'équipe MPP (Matériaux et Procédés Plasma) au LAPLACE, reconnu pour son expertise dans la modification des surfaces par procédés plasmas. Les parties sur l'étude par microscopie électronique en transmission et spectroscopie Raman exalté en surface ont été réalisées en étroite collaboration avec le CEMES (Centre d'élaboration de matériaux et d'études structurales). Cette étude pluridisciplinaire a mis en œuvre des compétences dans des domaines variés, comme la microbiologie, la physico-chimie des surfaces, la physique ou encore la mécanique des fluides. La caractérisation approfondie, allant d'une échelle macroscopique à une échelle atomique, menée aussi bien sur les microorganismes que sur les surfaces solides, a été un atout pour la compréhension précise des phénomènes observés et confère aux travaux présentés ici une approche originale.

Chapitre II : Matériels et méthodes expérimentales

Toutes les suspensions et solutions ont été préparées dans l'Eau Pour Préparations Injectables (EPPI) définie par la Pharmacopée Européenne (Cooper, traces de nitrate, de sulfate aluminium, de calcium et de magnésium). La valeur de pH de l'EPPI a été mesurée à 7.0, avec une conductivité de $1.2 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1. Préparation de la suspension de *Candida albicans*

1.1. Origine et conservation de *C. albicans*

La souche de levure choisie pour cette étude est *C. albicans* IP48.72 (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France). Elle est conservée à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution de cryoconservation. Avant réalisation des essais, la souche est remise en culture sur gélose de Sabouraud (BioMérieux, Crapone, France), incubée à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48 h.

1.2 Préparation des suspensions de travail

Les suspensions d'essai sont réalisées à partir d'aliqots congelés provenant des deuxièmes et troisièmes repiquages de *C. albicans* IP48.72 sur gélose de Sabouraud. Une culture est réalisée dans du milieu liquide de Sabouraud (Sabouraud Dextrose liquid Medium, OXOID, CM0147) (30 g/L , $\text{pH}=5.6$ à 23°C). Après 72 h d'incubation à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sans agitation (phase stationnaire de croissance) (après 4h dans le cas des essais à différentes températures d'incubation), les cellules sont récupérées après filtration à l'aide d'un filtre membrane à porosité nominale de $10 \mu\text{m}$ (Dutscher, filtre isopore). Cette filtration permet de maximiser la récupération de cellules uniques en éliminant les agrégats et les cellules sous forme d'hyphes. Après vérification de l'absence de contamination par observation au microscope optique ($\times 400$), les cellules sont collectées par centrifugation pendant 3 min à 13000 rpm à température ambiante, lavées deux fois puis remises en suspension dans de l'EPPI. Pour les essais, la suspension cellulaire est diluée pour atteindre une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ correspondant à 1.5 soit environ 1.10^7 UFC/mL . Un contrôle des UFC/mL est réalisé par dilutions de raison 10 de la suspension et inclusion de 1 mL de chaque dilution en gélose de Sabouraud (incubation 72h à 30°C).

1.3 Préparation des suspensions microbiennes pour les analyses de viabilité cellulaire

➤ *Contrôle de l'influence de l'EPPI et des marqueurs fluorescents sur la viabilité cellulaire*

Sachant que les levures restent en conditions statiques durant 1h30 dans la chambre à écoulement cisailé, nous avons voulu connaître l'influence de l'EPPI et des marqueurs fluorescents sur la viabilité des levures. Pour connaître l'influence de l'EPPI sur la suspension microbienne, 3 mL d'une suspension de levures dans de l'EPPI (DO_{600nm} correspondant à 1.5 soit environ 1.10^7 UFC/mL) sont placés en condition statique durant 1h30. Après ce temps d'attente, 9 μ l de chacun des marqueurs fluorescents ont été ajoutés à la suspension microbienne. Le principe du kit de fluorescence (ThermoFisher Scientific) utilisé est basé sur une double coloration par l'intermédiaire de deux fluorophores : le SYTO9[®] et l'Iodure de Propidium (IP). Le SYTO9[®] est un fluorophore qui, après excitation à 470 nm, émet une fluorescence de couleur verte à 540 nm. Ce marqueur possède la capacité de diffuser dans les cellules, intègres ou non, et d'émettre de la fluorescence une fois liée à l'ADN. Le SYTO9[®] permet donc de marquer la totalité des levures de l'échantillon. L'IP est un agent intercalant de l'ADN, une fois lié à ce dernier, il émet une fluorescence rouge (635 nm) après excitation à 470 nm. Ce fluorophore ne peut pénétrer que dans les cellules dont les membranes sont altérées, induisant alors une fluorescence rouge. Le dénombrement des levures viables et non viables a été effectué ensuite à l'aide du microscope confocal ZEISS AxioTech 100HD et du logiciel Zen 2.5 /Zen 2.3.1 Carl Zeiss Microscopy GmbH couplé avec le microscope. Le comptage des levures a ensuite été effectué à l'aide du logiciel ImageJ. Pour connaître l'influence des marqueurs fluorescents sur la viabilité des levures, 9 μ l de chacun des marqueurs fluorescents (Syto9[®] et IP) ont été ajoutés à dans la suspension microbienne (DO_{600nm} correspondant à 1.5 soit environ 1.10^7 UFC/mL). Les levures sont ensuite restées en condition statique durant 1h30 avec les marqueurs fluorescents. Après ce temps d'attente, le dénombrement des levures est effectué comme indiqué précédemment.

➤ *Expériences de viabilités cellulaires avec les différents nanocomposites*

Lors des analyses de viabilité des levures en présence de nos différents substrats nanocomposites, 9 μ l de chacun des marqueurs fluorescents ont été ajoutés à la suspension microbienne (préparé section 1.2, DO_{600nm} correspondant à 1.5 soit environ 1.10^7 UFC/mL). Les levures ont ensuite été injectées dans la chambre à écoulement cisailé et une photographie de la fluorescence émise par les levures a été effectuée. Les levures sont restées ensuite en

condition statique durant 1h30 dans la chambre en présence des différents substrats nanocomposites. Après ce temps d'attente, une autre photographie de la fluorescence émise par les levures a été effectuée. Comme indiqué précédemment, le dénombrement des levures viables et non viables a été effectué avec ImageJ.

2. Préparation des différentes solutions protéiques :

2.1 Protéine *Discosoma* Rouge Fluorescente (DsRed)

La DsRed (Biovision) est sous forme lyophilisée et présente une pureté de 97 %. Une solution mère de 1 g/L a été préparée dans de l'EPPI. La valeur de pH de la solution mère de DsRed était de 6.6. La stabilité du pH de la solution mère a été contrôlée pour toutes les mesures. Les mesures ont été effectuées à température ambiante ($23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). La solution mère de DsRed a ensuite été diluée de 4 à 20 fois dans de l'EPPI pour l'étude de la caractérisation des gouttelettes.

2.2 Sérum Albumine Bovine (SAB)

La SAB (Sigma-Aldrich) est sous forme de cristaux déshydratés. Une solution mère de 5 g/L a été préparée dans l'EPPI. La valeur de pH de la solution mère de SAB est de 5.6, tandis que le point isoélectrique (pI) de la SAB est de 4.7 dans l'eau à 25 °C. La stabilité du pH des solutions a été contrôlée durant toutes les mesures. Les essais avec la SAB ont été réalisés à température ambiante ($23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). La solution mère de SAB a ensuite été diluée de 5 à 100 fois avec de l'EPPI pour l'étude de la caractérisation des gouttelettes.

2.3 Fibronectine plasmatique humaine (Fn)

La Fn (Sigma-Aldrich) est sous forme lyophilisée. Une solution mère de 1 g/L a été préparée dans de l'EPPI. La solution mère de Fn a été diluée 2 à 100 fois dans de l'EPPI. Le pH de la solution mère de Fn a été mesuré à 7.5.

2.4 Création des gammes de pH des solutions protéiques

Une gamme de solution de DsRed et de SAB possédant des valeurs de pH de 3 à 11 a été préparée. La concentration protéique de la gamme a été fixée à 0.05 g/L. Les valeurs de pH de 3 et 5 ont été obtenues avec une solution tampon citrate-phosphate (0.5 M). Les valeurs de pH de 9 et 11 ont été obtenues avec une solution tampon bicarbonate de sodium/hydroxyde de

sodium ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$) à 0.05 M et 0.1 M respectivement. Les valeurs de pH de 3 et 5 ont été ajustées en ajoutant un volume prédéterminé d'acide citrique à 0.5 M. Les valeurs de pH de 9 et 11 ont été ajustées en ajoutant un volume prédéterminé de NaOH à 0.1 M.

3. Création des couches minces protéiques

Les couches minces protéiques ont été élaborées en utilisant la méthode d'enduction par trempage (dip-coating process). Le lecteur est prié de se reporter à l'annexe A pour des précisions sur le protocole utilisé. Les substrats spécifiques (en quartz et de Si couverts par une couche fine d'environ 100 nm de SiO_2) possédant une surface 1 cm x 1 cm ont été immergés durant une heure dans 1 mL des différentes solutions protéiques (SAB, DsRed et Fn). Les solutions protéiques ont été préparées à des concentrations allant de 0.01 à 5 g/L pour la SAB, de 0.01 à 0.1 g/L pour la DsRed et de 0.01 à 1 g/L pour la Fn. Les différents échantillons ont ensuite été immergés dans de l'EPPI pour enlever les protéines non adhérentes. Cette étape a été suivie d'une phase de déshydratation à température ambiante.

4. Élaboration et structure des substrats étudiés :

4.1 Élaboration des couches minces de silice thermique (SiO_2^{th})

Les couches minces de silice thermique (SiO_2^{th}) de 100 nm d'épaisseur ont été fabriquées par oxydation thermique d'une plaquette de Si (silicium) intrinsèque dans un four Nabertherm à 1100 °C, sous atmosphère légèrement oxydante en utilisant un mélange d'azote et d'oxygène ($\text{N}_2\text{-O}_2$) contenant 1 % d' O_2 .

Avant l'étude de l'interaction des protéines avec la couche de SiO_2 , la surface des échantillons a été nettoyée. Le nettoyage des substrats se fait dans une salle blanche sous atmosphère contrôlée (T° , taux de particules classe 100, chambre inactinique, indicateur d'humidité/eau). Les solutions utilisées lors du nettoyage sont de l'éthanol (95 % vol), de l'acétone (95 % vol) et de l'eau déionisée (filtrée sur filtre avec des pores de 200 nm). L'éthanol a été utilisé en premier, suivi de l'acétone et d'une phase de rinçage avec de l'eau déionisée. La charge de surface du substrat a été contrôlée en vérifiant la conductivité. La phase de rinçage dure jusqu'au moment où la conductivité de surface atteint la valeur zéro.

4.2 Élaboration des couches minces nanocomposites contenant des AgNPs par procédé plasma

4.2.1 Procédé plasma et description du réacteur plasma

Les couches minces nanocomposites à base de SiO₂ et d'AgNPs ont été réalisées dans un réacteur plasma froid au LAPLACE (Despax and Raynaud, 2007). Ce procédé plasma permet de coupler la pulvérisation métallique, suite au bombardement par des ions d'argon, d'une cible d'argent avec la polymérisation par plasma d'un précurseur organosilicié (hexaméthylidisiloxane, HMDSO, SiO₂(CH₃)₆). Les deux processus sont réalisés dans le même réacteur par une décharge électrique asymétrique radiofréquence (RF, 13.56 MHz) à couplage capacitif, entretenue à basse pression du gaz, dans l'Ar ou dans un mélange gazeux argon-HMDSO-O₂. Le réacteur utilisé est présenté sur la figure II-1. Il s'agit d'un plasma de type diode, *i.e.* il existe une grande asymétrie entre la petite électrode supérieure (cible d'argent) reliée au générateur du signal RF et l'électrode inférieure en contact avec les parois du réacteur connectées à la masse. L'électrode cible en argent est à l'origine de la formation des nanoparticules d'argent par pulvérisation. Les substrats possédant une surface de 1.0 cm² (17.5 x 5.70 mm²) sont placés sur l'électrode inférieure, qui constitue l'électrode porte-substrats. Afin d'éviter un dépôt continu sur le substrat, un masque amovible métallique est positionné dans la partie basse du plasma, au-dessus du substrat. Dans un premier temps, le réacteur est placé sous vide secondaire pendant 12 heures ($p = 1 \times 10^{-6}$ Torr). Lors des dépôts, la faible pression de l'ordre du Pascal est maintenue par un flux d'argon très pur (Air Liquide ALPHAGAZ™ 2, pureté : 99.9995 %) couplé à de l'oxygène pur (AirLiquid, ALPHAGAZ™ 2, pureté : 99.9995 %) Le débit du mélange est contrôlé par un équilibre entre les débitmètres Tylan (Tylan ® 260 series, débit maximal d'argon – 7 sccm ; Tylan ® 260 series, débit maximal d'oxygène – 5 sccm) et le pompage primaire (pompe à palettes de marque Leybold). L'hexaméthylidisiloxane (HMDSO) utilisé provient de Sigma Aldrich (pureté > 99.5 %), sous forme liquide. Celui-ci est chauffé à 50 °C et passé sous forme gazeuse pour être ajouté au mélange de gaz. Pour éviter la condensation du gaz réactif sur les parois, la ligne d'injection et les parois du réacteur sont maintenues à 40 °C à l'aide de cordons chauffants. L'injection dans la phase plasma se fait par l'anneau d'injection. La spécificité du système utilisé est qu'il permet une injection pulsée de l'hexaméthylidisiloxane à l'aide d'un contrôleur de flux (OMICRON) couplé à un générateur de pulses basses fréquences (AGILENT). Le pulse est défini par une

période $T = t_{on} + t_{off}$ où t_{on} correspond au temps où l’HMDSO est injecté. L’amplitude de pulse A (V) définit l’ouverture du débitmètre ; $A = 1$ V permet l’injection de 0.4 sccm d’HMDSO en régime continu. La pression du mélange gazeux dans l’enceinte lors des expériences est mesurée à l’aide d’une jauge Baratron MKS.

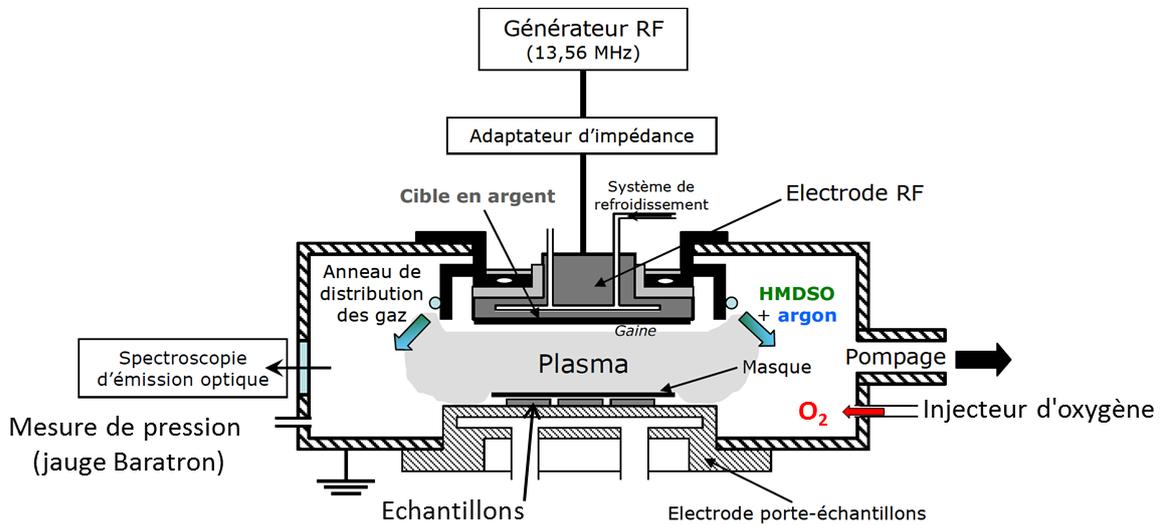


Figure II-1 : Schéma récapitulatif du principe de dépôt par procédé plasma RF du film composite, constitué de nanoparticules d’argent incluses dans la matrice organosiliciée.

4.2.2 *Élaboration des couches minces avec des AgNPs exposées à la surface d’une couche mince de SiO₂th*

Le procédé plasma offre la possibilité de contrôler la densité de la matrice hôte en cours de dépôt, mais permet également de concevoir toute une gamme d’échantillons avec un taux d’Ag et des AgNPs de taille variable (Pugliara *et al.*, 2015). Les couches composées d’un plan d’AgNPs exposées à la surface d’une couche de SiO₂th de 80 nm sur un substrat de Si ont été élaborées par pulvérisation d’argent. Dans ce travail de thèse nous avons élaboré ces structures stratifiées en suivant la méthodologie développée par Pugliara *et al.* (2015, 2016). Le raisonnement et les étapes d’élaboration et de diagnostic lors du dépôt par plasma sont détaillés dans les travaux de Pugliara *et al.* (2015). Ici, nous allons reprendre les grandes lignes nécessaires pour décrire la structuration des couches minces utilisées et la procédure d’élaboration.

Avant l’application du procédé plasma, la couche de SiO₂th est nettoyée dans une solution de Piranha pendant 2 minutes et rincée à l’eau déionisée. Le plan d’AgNPs est ensuite créé par pulvérisation d’argent durant 5 s dans une décharge d’Ar maintenue à basse pression

$p_{Ar} = 40$ mTorr (débit d'Ar : 2.8 sccm) avec une puissance $P = 80$ W (tension d'autopolitisation $V_{dc} = -950$ V). Nous obtenons ainsi un plan d'AgNPs directement à la surface de la couche de SiO_2^{th} (Fig. II-2). La densité des AgNPs est de 3.6×10^{11} AgNPs/cm² et leur taille moyenne est de 19.6 ± 7.8 nm. Le taux de couverture de la surface est de 42.6 %.

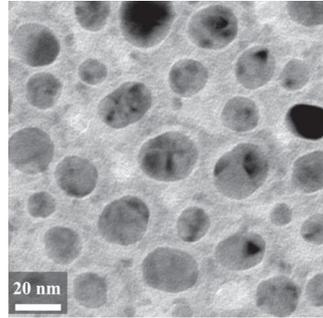


Figure II-2 : Image MET en vue plane observée en champ clair du plan des AgNPs (Pugliara *et al.*, 2015; Pugliara *et al.*, 2016).

4.2.3 Structure des nanocomposites avec AgNPs enterrées dans une couche de silice plasma

La deuxième structure utilisée pour ce travail consiste en un plan d'AgNPs enterrées dans une couche de silice à une distance contrôlée de 5.5 nm de la surface. De nouveau pour l'élaboration de ces structures nous avons suivi le travail de Pugliara *et al.* (2015, 2016). Le plan d'AgNPs est obtenu comme il décrit dans la section précédente. Ensuite la couche de couverture de SiO_2^{plasma} est déposée dans une décharge entretenue dans un mélange d'Argon-HMDSO- O_2 à basse pression $p_{total(Ar+HMDSO+O_2)} = 52.5$ mTorr (débit d'Ar : 2.8 sccm, débit d' O_2 : 1.25 sccm, débit moyen par pulse d'HMDSO : 0.25 sccm) par une puissance de 120 W (tension d'autopolarisation $V_{dc} = -880$ V). La forte originalité de cette procédure est l'injection pulsée d'HMDSO avec $t_{on} = 3.1$ s et une période de 5 s, permettant de déposer des couches de SiO_2^{plasma} d'une qualité très proche de celle de la SiO_2^{th} . Le temps de dépôt est de 30 secondes.

La figure II-3 montre les images (a) d'une vue plane et (b) d'une coupe transversale d'un substrat spécifique élaboré par procédé plasma (Pugliara *et al.*, 2015). La couche de SiO_2 couvrant les AgNPs, du fait de sa faible épaisseur, est conforme aux nanoparticules (épaisseur constante de la couche de SiO_2), ce qui représente une particularité de cette méthode d'élaboration par plasma. Cette faible épaisseur permet de contrôler la quantité d' Ag^+ relarguée et ainsi le degré de toxicité de ces couches nanocomposites vis-à-vis des microorganismes.

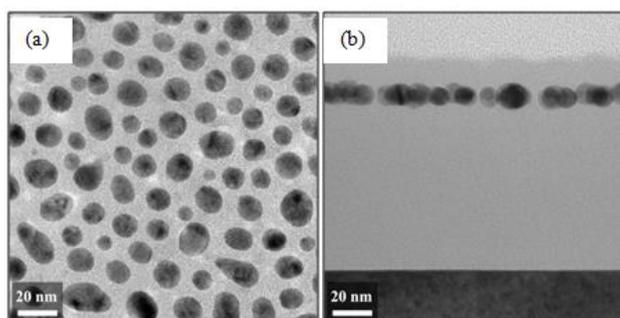


Figure II-3 : Images MEB (a) vue plane et (b) coupe transversale d'une couche nanocomposite élaborée par procédé plasma, contenant des AgNPs enterrées dans une matrice de silice à une distance contrôlée de la surface (Pugliara *et al.*, 2015).

5. Caractérisation physico-chimique et optique des gouttelettes et des couches minces protéiques déposées à la surface des substrats nanocomposites

5.1 Mesures de l'angle de contact

Des gouttelettes protéiques (SAB, DsRed ou Fn) de $3.8 \pm 0.1 \mu\text{l}$ ont été déposées sur la surface des couches minces de SiO_2^{th} seules ou des nanocomposites composés d'un plan d'AgNPs enterrées à une distance nanométrique contrôlée dans une matrice de SiO_2 ou exposées à sa surface. La déshydratation des gouttelettes a été suivie au cours du temps par mesure de l'angle de contact à l'aide du Digidrop goniomètre, produit par GBX scientifique instrument. Les gouttelettes ont été déposées avec une microseringue Gastight 1700 séries fixée sur le goniomètre et offrant la possibilité de contrôler avec précision le volume déposé. L'enregistrement et l'analyse des résultats ont été réalisés à l'aide du logiciel (Windrop) couplé au goniomètre. La précision de la mesure de l'angle de contact est de $\pm 0.1^\circ$. Les résultats présentés dans cette thèse ont été moyennés sur trois mesures indépendantes sur les substrats.

5.2 Caractérisation par microscopie optique et microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images optiques des gouttes déshydratées ont été enregistrées par un microscope numérique Keyence VHX-1000. Les paramètres (diamètre (d), épaisseur du rebord...) des gouttes ont été mesurés avec le logiciel VHX version 1.3.0.7 associé au microscope.

Les photographies en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ont été réalisées au sein du service commun du centre de microcaractérisation Raimond Castaing (UMS 3623) à Toulouse, en collaboration avec Stéphane Le Blond du Plouy. Le microscope principalement utilisé est un JEOL JSM 7800F prime équipé d'une source d'électrons à émission de champ de type Schottky. La résolution est de 0.8 nm. Il est de plus équipé d'un détecteur par analyse dispersive en énergie (EDS) (SDD X-Max 80 mm² Oxford Instruments AZtecEnergy) permettant d'analyser la composition élémentaire de l'échantillon avec une résolution de 5 nm. Pour les échantillons étudiés dans cette thèse, la tension d'accélération appliquée varie entre 10 keV et 3 keV. De la tension d'accélération dépend la pénétration des électrons dans l'échantillon. Pour effectuer l'analyse topologique des différents dépôts protéiques, de faibles tensions ont été privilégiées. De plus, dans notre cas l'utilisation d'une couche de SiO₂ diélectrique sur le substrat de Si peut entraîner la charge de l'échantillon lors de l'application du faisceau d'électrons. Cette charge doit être évacuée afin d'éviter la détérioration de l'échantillon par surchauffe. La surface des échantillons a donc été rendue conductrice à l'aide d'un métalliseur Pt JEOL JFC-2300HR ou d'un système de pulvérisation cathodique et évaporation Carbone Leica EM ACE600. Ces conditions ont permis d'obtenir une meilleure conductivité et de garantir l'évacuation de la charge tout en protégeant les couches fines protéiques.

5.3 Mesures des spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence de la DsRed déshydratée ont été obtenus en excitant la DsRed avec un laser d'argon opérant à 514 nm. La lumière émise a été dispersée en utilisant un spectromètre Jobin Yvon avec 150 traits/mm.

5.4 Mesures des spectres d'adsorption

Les spectres d'absorption des solutions protéiques ont été obtenus à température ambiante à partir des mesures de transmission optique à l'aide d'un Spectrophotomètre UV-vis Hewlett Packard HP8452A à réseau de diodes UV-vis dans la gamme 190-820 nm. Ces mesures nous ont permis de mettre en évidence les différences entre les propriétés optiques des deux différentes protéines étudiées (SAB et DsRed) et également de valider le choix du meilleur modèle optique requis pour les simulations ellipsométriques.

5.5 Mesures de l'épaisseur des couches minces protéiques déshydratées par ellipsométrie

Les mesures ellipsométriques ont été effectuées à l'aide d'un ellipsomètre Semilab SE-2000 possédant un polariseur rotatif et un analyseur fixé dans la gamme spectrale de 250 à 1700 nm. Afin de maximiser la précision des spectres enregistrés lors des mesures, l'angle d'incidence a été réglé à 75°, ce qui est le plus approprié pour les substrats en Si. Toutes les mesures ont été effectuées entre 250 et 850 nm avec un pas de 5 nm. Après l'acquisition des données, une analyse numérique a été nécessaire pour extraire l'information concernant la couche mince protéique. Cependant, il est nécessaire de disposer de paramètres "connus" comme la réponse diélectrique ϵ du substrat. Pour cette raison, nous avons caractérisé les propriétés du substrat, en particulier l'épaisseur de la couche mince de SiO₂ par des mesures SE avant que les couches protéiques ne soient déposées. La simulation des spectres enregistrés a été réalisée avec le logiciel SE Analyzer-SEA (SEMILAB 2017) fourni par Semilab. Un modèle triphasé a été utilisé pour caractériser la SiO₂ diélectrique sur des substrats en Si. La détermination de l'épaisseur des couches minces protéiques a nécessité le choix approprié du modèle de simulation de la loi de dispersion, en fonction des propriétés optiques des protéines. Les différentes mesures de l'épaisseur des couches protéiques ont été effectuées au LAPLACE.

5.6 Mesures des spectres FTIR de gouttelettes protéiques déshydratées

Pour obtenir des informations sur la composition des couches protéiques déshydratées, les spectres FTIR ont été acquis avec un spectromètre Bruker Vertex 70 en mode transmission, dans la gamme de 400-4000 cm⁻¹ avec une résolution de 2 cm⁻¹. L'analyse a été réalisée à travers l'échantillon, dans son épaisseur. Ce mode de transmission a pu être possible grâce à la transparence à la lumière infrarouge des substrats Si intrinsèques utilisés. Le rayonnement infrarouge est envoyé sur l'échantillon à travers un interféromètre de Michelson, qui permet de collecter simultanément l'information à toutes les longueurs d'onde, à l'aide d'un détecteur pyroélectrique DTGS (Sulfate de triglycine). L'interférogramme obtenu est ensuite converti en un spectre infrarouge à l'aide de la « transformée de Fourier ». L'enceinte de mesure, dans laquelle est placé le coupon, est purgée en permanence par un flux d'azote sec, pour éliminer l'eau et le dioxyde de carbone présents dans l'atmosphère ambiante. Les différentes mesures de spectre FTIR ont été effectuées au LAPLACE.

5.7 Mesures des spectres Raman de la DsRed déshydratée

Les spectres Raman ont été obtenus en utilisant le spectromètre Raman de haute résolution Labram HR 800 Horiba Jobin-Yvon Xplora, muni de trois lasers : 532, 632, 785 nm. Le laser à 532 nm a été utilisé pour exciter la diffusion Raman. Le faisceau laser a été focalisé sur une zone uniforme de la goutte (couche fine) de DsRed déshydratée en utilisant l'objectif x100. Afin d'éviter une possible dégradation des protéines, en raison du chauffage laser, l'intensité de l'incident était limitée à 1 % de sa valeur maximale (environ 0.15 mW à 532 nm). Les spectres Raman ont été accumulés pendant 10 s. Le spectre théorique de la DsRed et le spectre moyen pour chaque échantillon ont été calculés. Les analyses Raman ont été réalisées au CEMES de Toulouse.

6. Caractérisation des surfaces avec ou sans couches minces de protéines

L'ensemble des techniques évoquées dans cette section a été appliqué pour caractériser l'état de surface de nos différents substrats nanocomposite. Les substrats nanocomposites étaient composés soit d'une couche mince de SiO_2^{th} , soit d'un plan d'AgNPs exposé à la surface ou encore d'une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans laquelle ont été enterrées des AgNPs. L'ensemble des couches minces protéiques (DsRed, SAB et Fn) élaborées à la surface de ces différents substrats nanocomposite à l'aide de la méthode d'enduction par trempage a également été caractérisé à l'aide de ces différentes techniques.

6.1 Mouillabilité

Une manière d'étudier les interactions entre liquide et substrat solide est de déposer une goutte sur la surface du solide (nettoyé), on parle de goutte sessile, en opposition au cas de la goutte tombante. Lorsque le liquide est déposé à la surface solide, un équilibre entre les phases solide, liquide et gazeuse s'établit et le système liquide peut prendre la forme d'une goutte hémisphérique. La tangente à la goutte au point de contact entre les trois phases (ligne triple ou ligne de contact) forme un angle appelé angle de contact ou angle de Young θ_Y . La mouillabilité est caractérisée par l'angle de contact (θ) du liquide sur le solide qui dépend de trois tensions interfaciales (solide-liquide, solide-vapeur et liquide-vapeur) comme représenté sur la figure II-

4. A l'équilibre, la somme des trois forces appliquées à la surface est nulle. Ce qui conduit à la relation de Young :

$$\gamma_{LV} \cos \theta_E = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (4)$$

La goutte aura plus tendance à se répandre si les interactions solide-liquide sont plus attractives que les interactions liquide-liquide. Cet angle sera alors plus petit et on parle de liquide mouillant. La méthode la plus répandue pour évaluer l'hydrophilie ou l'hydrophobie d'une surface s'effectue à travers l'analyse de l'angle de contact avec une goutte d'eau (Neumann and Good, 1979). Cette méthode consiste à déposer une microgoutte d'eau sur une surface placée horizontalement. La photographie de la microgoutte sur la surface permet de mesurer l'angle de contact. Si l'angle de contact mesuré est inférieur à 90°, il s'agit d'une surface hydrophile, tandis que si cet angle est supérieur à 90°, il s'agit d'une surface hydrophobe. Si l'angle de contact est supérieur à 150°, la surface est qualifiée de superhydrophobe. De même si l'angle de contact est inférieur à 30°, la surface est appelée super-hydrophile.

La mouillabilité caractérise la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur une surface solide. C'est un paramètre fondamental pour déterminer les propriétés adhésives d'une surface et étudier les mécanismes sous-jacents.

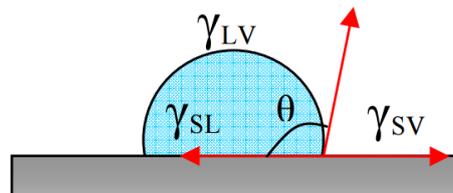


Figure II-4 : Mouillabilité d'une surface solide par un liquide et représentation des forces appliquées sur la goutte déposée.

6.2 Microscopie optique et électronique à balayage (MEB)

➤ *Le microscope optique*

Le microscope optique ou microscope photonique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de

séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en biologie par exemple pour observer les cellules, les tissus ou en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage etc. L'objet à observer est placé devant le premier groupe optique appelé « objectif ». Si l'objet est au-delà de la distance focale, une image réelle renversée de taille différente est produite. A une distance inférieure au double de la distance focale de l'objectif l'image qui se formera est une image plus grande que l'objet. Le deuxième groupe optique du côté de l'observateur est l'oculaire : il est positionné de sorte que l'image soit dans son plan focal. La figure II-5 montre l'image et le schéma constitutif d'un microscope optique simple, mais il existe beaucoup de conceptions complexes qui visent à améliorer la résolution et le contraste de l'échantillon. De plus, l'image d'un microscope optique peut être capturée par les caméras qui sont sensibles à la lumière pour produire une micrographie. Des microscopes purement numériques sont maintenant disponibles et utilisent une caméra CCD (Charge-Coupled Device) qui permet d'examiner un échantillon, montrant l'image obtenue directement sur un écran d'ordinateur sans avoir besoin d'oculaires. Cette technique permet de mesurer et d'évaluer des échantillons mais la limite de dimensions « observables » est de l'ordre du μm (objectif x100 ; oculaire x10 ; sous immersion).

Dans cette thèse nous avons utilisé un microscope en réflexion qui permet d'illuminer et d'observer l'échantillon du même côté. La lumière observée provenant de l'échantillon n'est donc pas transmise mais réfléchie. La lumière arrive par l'objectif pour atteindre l'objet, puis est réfléchie et réacheminée vers l'objectif par un système de miroirs. Cette technique permet donc de visualiser la surface d'objets opaques ou épais.

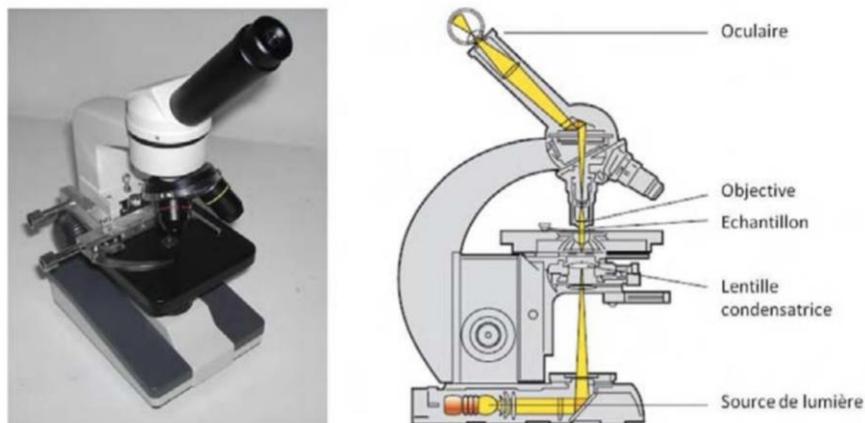


Figure II-5 : Photographie d'un microscope optique simple et de son schéma constitutif (Chen, 2014)

➤ *La microscopie électronique à balayage*

La microscopie électronique à balayage (MEB) (ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique d'observation de la topographie des surfaces. Elle est principalement fondée sur la détection de particules ou rayonnements (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger ou rayons X) émergents de la surface de l'échantillon sous l'impact d'un très fin faisceau d'électrons primaires qui balaye cette surface (Fig. II-6). L'analyse par différents détecteurs d'électrons spécifiques (secondaires, rétrodiffusés...) des différentes particules réémises permet ainsi d'obtenir des images en trois dimensions de la surface, avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ. Typiquement un MEB est alors essentiellement composé : d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon ; d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions ; de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. Les observations se font sous vide secondaire et de ce fait le MEB est doté d'un système de pompes à vide.

Trois modes de détections sont principalement utilisés :

- UED : pour « upper electron detector », adapté pour l'analyse proche de l'échantillon à de faibles énergies d'accélération des électrons.
- LED : pour « lower electron detector » adapté pour des prises de vue plus éloignées de la surface de l'échantillon à des énergies d'accélération plus élevées.
- BSD : pour « back scattering electron detector ». Les éléments les plus lourds ressortent de façon plus intense permettant d'estimer la répartition des espèces sur l'image.

Un dernier mode « ADD » pour addition permet de combiner des images issues de différents modes.

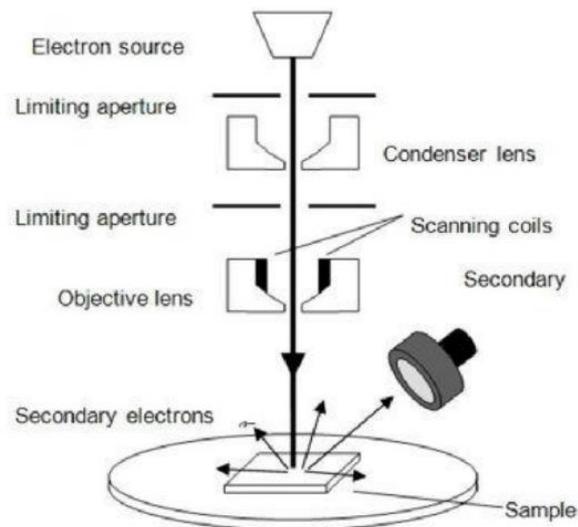


Figure II-6 : Schéma du trajet des électrons dans un microscope électronique à balayage. Après avoir été focalisés par des lentilles les électrons frappent l'objet et des électrons secondaires sont émis et collectés afin de reconstituer l'image (Williams, 2006).

Le choix de ces modes dépend des observations des échantillons. Pour chaque analyse, le mode utilisé est sélectionné en fonction du rendu permettant le mieux d'apprécier la morphologie de surface.

6.3 Ellipsométrie

L'ellipsométrie spectroscopique est une méthode d'analyse optique de surface très sensible, permettant de sonder à différentes échelles et à différentes énergies les propriétés physiques et morphologiques d'un échantillon plan. La technique permet d'obtenir des informations sur la surface d'un échantillon massif, sur le volume d'une couche mince ou encore sur les interfaces. Un faisceau lumineux collimaté est polarisé linéairement grâce à un polariseur. Le faisceau est réfléchi sur l'échantillon, ce qui modifie son état de polarisation. Il passe ensuite dans un analyseur avant d'arriver dans un miroir reconduisant le faisceau dans une fibre optique reliée au spectromètre (Fig. II-7). C'est de ce principe que découle la très grande sensibilité de la mesure ainsi que sa large gamme d'utilisation. Ainsi, un ellipsomètre ne mesure physiquement que deux paramètres : l'état de polarisation de la lumière et l'intensité du rayonnement après réflexion. Les paramètres physiques de l'échantillon analysé sont issus de modèles des interactions onde-matière. Parmi les nombreuses applications possibles, on peut citer :

- La mesure des constantes optiques (indice de réfraction et coefficient d'extinction) des matériaux ;

- La mesure de l'épaisseur de couches minces transparentes (du nanomètre au micromètre) ;
- Le suivi *in situ* de la croissance d'une couche ;
- La caractérisation des interfaces liquide-solide ou liquide-liquide ;
- La mesure de rugosité d'une surface ;
- La mesure, par scatterométrie, des propriétés (matériaux, géométrie) d'un motif périodique.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la mesure de l'épaisseur et des propriétés optiques de couches minces de SiO_2^{th} , de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ déposées par plasma et des couches minces protéiques déposées sur la surface des couches de silice et nanocomposites.

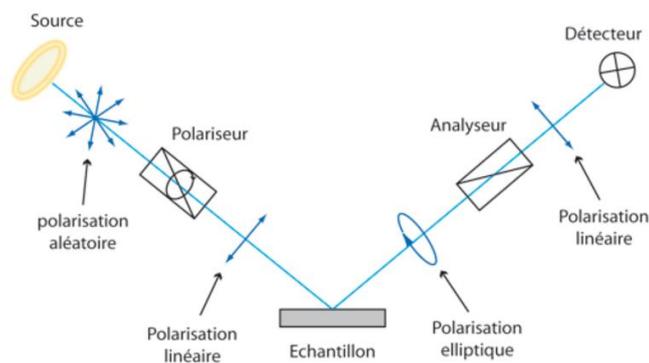


Figure II-7 : États de polarisation après les différents éléments d'un ellipsomètre à modulation par polariseur tournant. La polarisation devient rectiligne après que le faisceau a traversé le polariseur et elliptique après réflexion sur la surface de l'échantillon. Enfin, elle redevient linéaire après l'analyseur (Borella, 2006).

6.4 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est une technique non destructive, simple et rapide à mettre en œuvre qui permet de déterminer la nature des liaisons présentes au sein d'un matériau. Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau. Lorsque la fréquence de résonance du faisceau infrarouge, c'est-à-dire sa longueur d'onde est proche de l'énergie de vibration du groupe chimique, celui-ci absorbe le rayonnement et entre en mouvement. Cette absorption provoque une diminution de l'intensité lumineuse transmise. Comme présenté dans la Figure II-8, les mouvements des groupes

chimiques sont classés en différentes catégories selon que les atomes vibrent dans l'axe de leur liaison, dans le plan qu'ils forment ou hors de ce plan. En effet, il existe les mouvements d'étirement (asymétrique, symétrique) ou de déformation (cisaillement, balancement) dans le plan et également des mouvements de déformations hors du plan (rotation, torsion). La position des bandes d'absorption des fonctions chimiques, comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} dépend entièrement des masses atomiques et des forces de liaison. La position des bandes d'absorption est donc associée à une liaison particulière et permet par conséquent, l'identification qualitative de la composition et de la structure chimique du matériau.

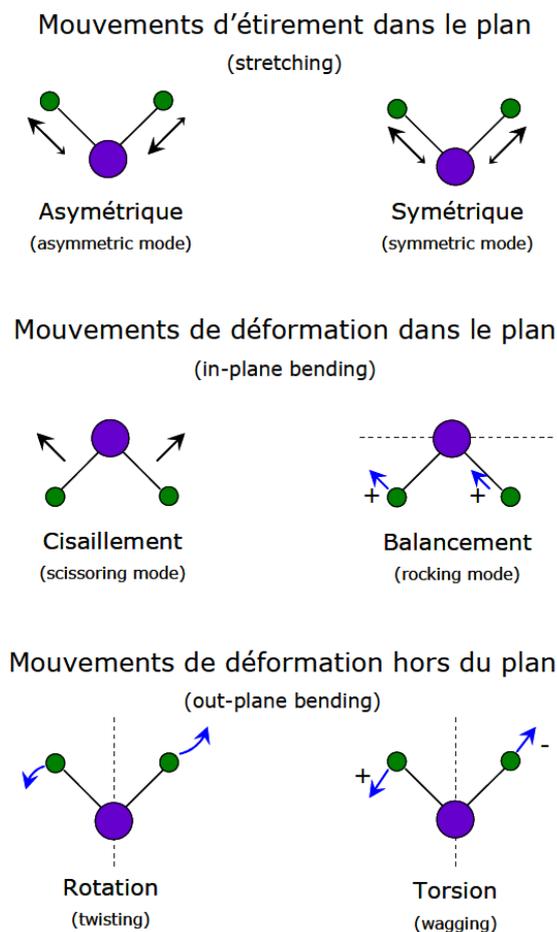


Figure II-8 : Les différents modes de vibration d'une molécule (Saulou, 2009).

6.5 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman consiste en la diffusion inélastique au sein du matériau, d'un photon émis par une source monochromatique comme un laser. Lors de l'interaction entre le faisceau lumineux et la matière, une partie du faisceau lumineux est réfléchi, une partie est

diffusée et une partie peut être transmise à travers l'échantillon. L'échange d'énergie entre les photons incidents et l'échantillon conduit à la vibration des liaisons entre les atomes de cet échantillon et provoque par conséquent une différence entre la longueur d'onde de la lumière diffusée et la lumière incidente (Fig. II-9). Cette différence correspond à un décalage en fréquence qui est caractéristique du matériau. L'étude de la lumière diffusée permet donc une analyse qualitative de la composition et de la structure chimique de l'échantillon. Cette technique non destructive est complémentaire de la spectroscopie infrarouge, car elle cible plutôt les vibrations des structures homonucléaires ($-C-C-$, $-C=C-$, etc.), qui sont, elles, peu visibles en spectroscopie IR.

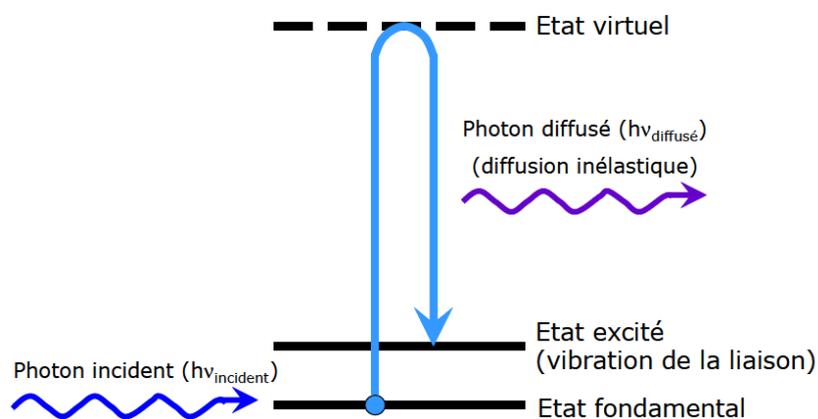


Figure II-9 : Principe de la spectroscopie Raman (Saulou, 2009).

7. Détermination du profil de détachement de *Candida albicans* par méthode hydrodynamique

7.1 Description et montage de la chambre à écoulement cisailé

L'adhésion et le détachement de *C. albicans* aux différents substrats SiO₂ ou nanocomposites ont été étudiés *in vitro* par méthode hydrodynamique grâce à une chambre à écoulement cisailé (Biosurface Technologies Corporation, USA). La chambre à écoulement utilisée dans ce travail a été adaptée de celle utilisée précédemment par Claire Saulou *et al.* (2009). Cette chambre optimisée est composée de plusieurs éléments superposés. Le premier élément est la plaque inférieure en acier qui constitue le support du dispositif et qui peut être fixée à la platine d'un microscope.

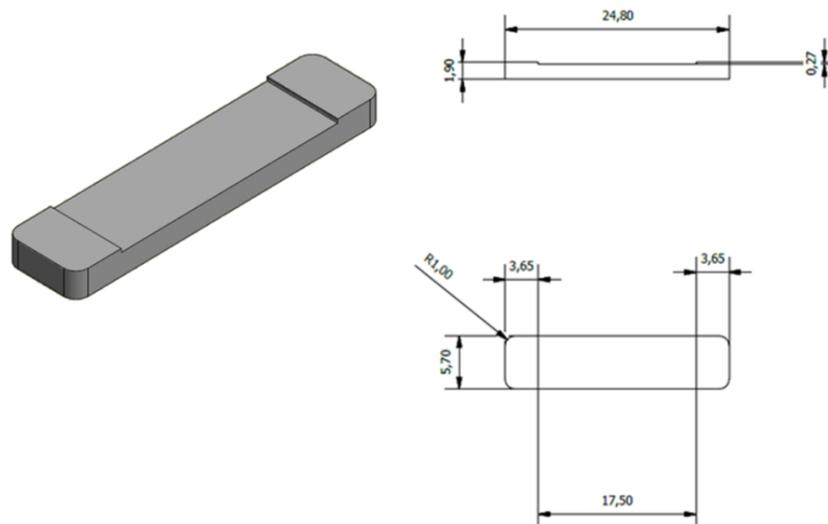


Figure II-10 : Schéma représentant les dimensions du support de contenance.

Une autre plaque fixée au-dessus possède les orifices et les canaux horizontaux d'entrée et de sortie du fluide. Cette plaque constitue le canal d'écoulement et un logement dédié permet d'insérer le coupon à analyser (Fig. II-10) (dimensions du réceptacle (longueur, largeur, épaisseur) = 25 mm x 6 mm x 2 mm). Les différents coupons ont été prédécoupés (16.9 mm x 5.7 mm x 0.27 mm) et fixés sur un support de contenance en acier inoxydable. Les dimensions de pré-découpage ont été choisies dans le but d'obtenir une surface de 1 cm² permettant d'avoir des estimations issues de la même surface active et rendant ainsi l'analyse quantitative. Le support de contenance a été conçu pour garantir l'uniformité de l'écoulement laminaire dans la chambre à écoulement cisailé. Les dimensions du support de contenance (25 mm x 5.70 mm x 1.63 mm) sont décrites dans la figure II-10 et 11. Le canal d'écoulement *in fine* a une largeur de 12 mm et une hauteur de 200 µm. La partie parallélépipédique du canal est précédée d'un

divergent afin d'assurer l'uniformité du profil de vitesse en entrée de cette zone. Elle est suivie d'un convergent permettant d'éviter la formation de tourbillons en sortie. Les deux premières plaques sont recouvertes d'une lame de verre (60 mm x 24 mm x 1 mm) permettant l'observation par microscopie optique, d'un joint torique en silicone (0.5 mm d'épaisseur assurant l'étanchéité de la chambre) et d'une autre plaque supérieure en acier inoxydable (Fig. II-12). Cette dernière plaque possède une fenêtre permettant la visualisation du substrat analysé. Les différents éléments sont percés de 10 pas de vis qui sont répartis en périphérie et permettent le serrage et le maintien de l'ensemble du dispositif. La chambre à écoulement cisailé a été caractérisée d'un point de vue hydrodynamique grâce au logiciel Comsol Multiphysics par Saulou et ces collaborateurs (Saulou *et al.*, 2009). Cette étude a montré que l'écoulement du fluide s'établit à partir d'une distance de 5 mm par rapport au début du coupon. Durant les expérimentations, la zone d'observation a donc été choisie à une distance d'environ 20 mm du début du coupon pour s'assurer d'une marge de sécurité. Dans la zone d'observation, la contrainte de cisaillement pariétale est uniforme et est calculée par la relation suivante (Guillemot *et al.*, 2006) :

$$\tau_p = \frac{3\mu Q}{4h^2l}, \quad (1)$$

Avec

τ_p : la contrainte de cisaillement pariétale (Pa),

Q : le débit du fluide (m³/s),

μ : la viscosité dynamique du fluide (Pa.s),

h : la demi-hauteur du canal (m)

l : la demi-largeur du canal (m).

Pour la chambre utilisée dans nos expériences, la demi-hauteur $h = 100 \mu\text{m}$ soit 10^{-4} m et la demi-largeur $l = 6 \text{ mm}$ soit $6 \cdot 10^{-3}$ m. La viscosité dynamique du fluide utilisé (EPPI) est estimée égale à celle de l'eau, avec $\mu = 10^{-3}$ Pa.s (à température ambiante 23 °C).

Après la prise en compte des différentes constantes, l'équation devient :

$$\tau_p = Q \times 12.5 \times 10^6, \quad (2)$$

Le nombre de Reynolds (Re) est déterminé selon l'équation suivante :

$$Re = \frac{q}{2lv}, \quad (3)$$

Avec

ν : la viscosité cinématique du fluide (m²/s)

La viscosité cinématique du fluide utilisé (EPPI) est estimée égale à celle de l'eau, avec $\nu = 10^{-6}$ m²/s (à 23 °C). Les expérimentations ont été effectuées à température ambiante (soit environ 23 °±2°C).

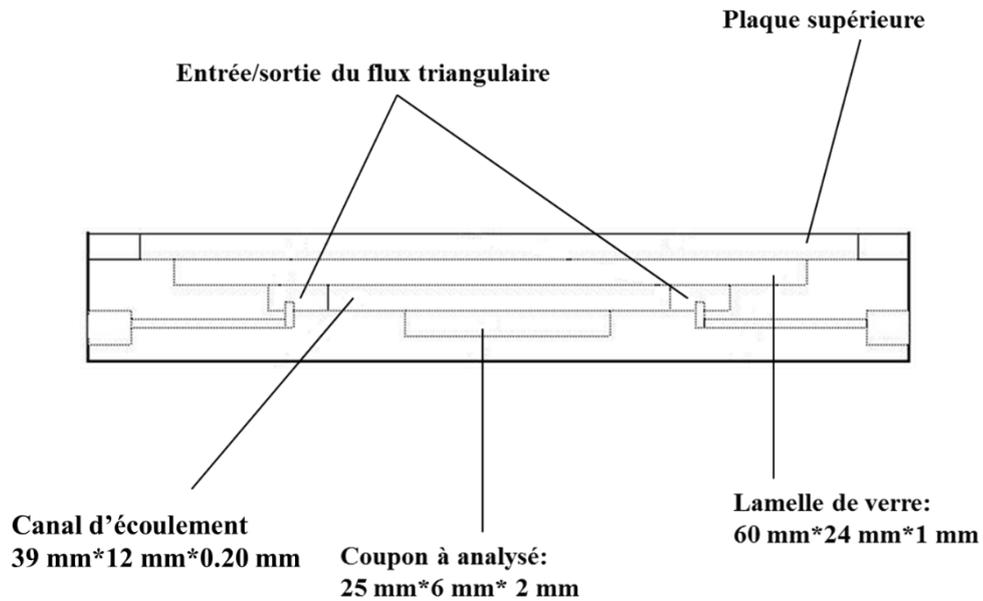


Figure II-11 : Schéma d'une vue de face de la structure de la chambre à écoulement cisaillé.

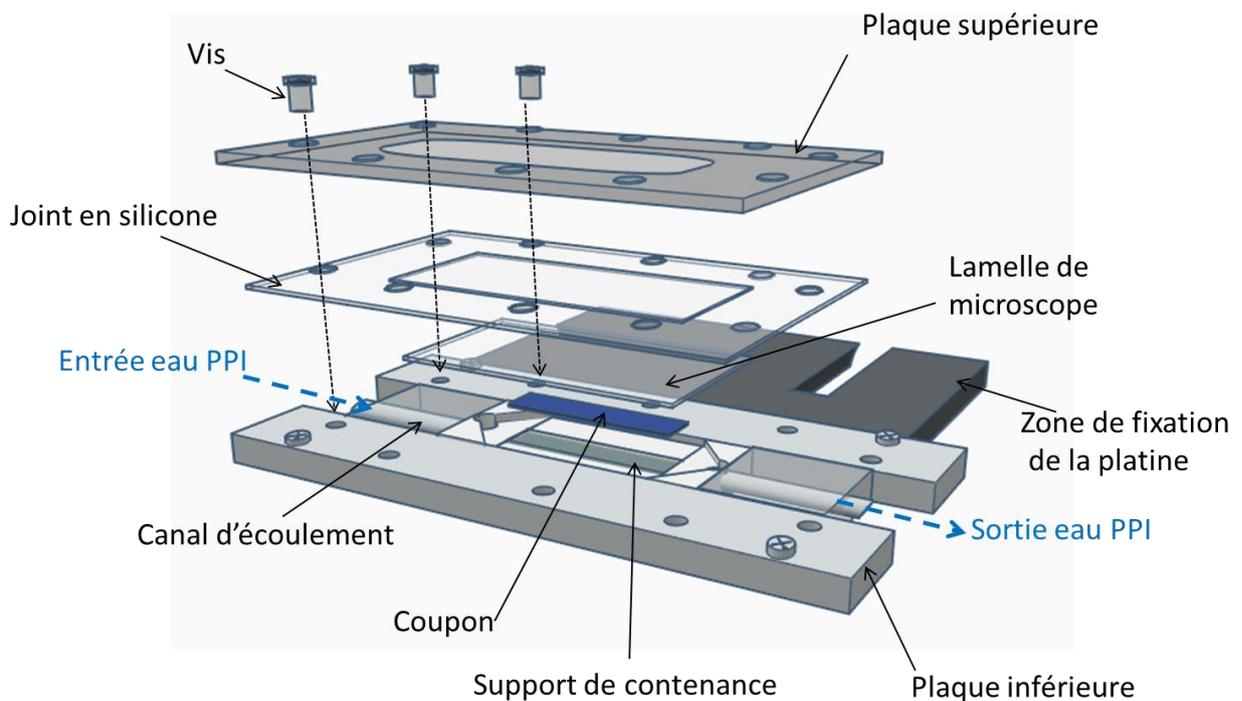


Figure II-12 : Schéma représentant une vue éclatée de la chambre à écoulement cisaillé.

7.2 Réalisation des essais de détachement cellulaire

Les expériences de détachement cellulaire sont réalisées à température ambiante grâce au dispositif global présenté dans la figure II-13. La chambre à écoulement cisailé est tout d'abord assemblée, reliée aux tuyaux d'entrée et de sortie du fluide, puis fixée sur la platine du microscope optique (Keyence VHX-1000). Le réservoir rempli d'EPPI est ensuite connecté à une pompe péristaltique (MasterFlex, Bioblock Scientific). Le tuyau de sortie de la pompe péristaltique est relié à un embout en Y connecté également à un pousse seringue (CMA/100 microinjection pump). Le tuyau de sortie de l'embout en Y est ensuite connecté à un « attrape bulle », qui est également relié à une vanne et à un orifice d'injection. L'orifice d'injection qui est placé juste avant la chambre à écoulement, permet d'injecter la suspension microbienne à analyser. Un deuxième réservoir connecté à la sortie de la chambre à écoulement permet la récupération du fluide injecté dans le dispositif global. Après avoir connecté l'ensemble du dispositif, la procédure de remplissage des différents tuyaux par l'EPPI peut débuter. La vanne 2 est fermée et la pompe péristaltique est actionnée, permettant ainsi le remplissage du tuyau en se connectant au pousse seringue. Après le remplissage de ce tuyau et en prenant garde à l'évacuation des bulles, la seringue de 10 mL du pousse seringue est remplie et est connectée. La vanne 1 est ensuite fermée et la vanne 2 est ouverte pour permettre le remplissage de l'ensemble des tuyaux, de l'orifice d'injection et de la chambre à écoulement cisailé. Etant placé après l'attrape bulle, le remplissage de l'orifice d'injection permet d'éviter le relargage de bulles dans la chambre à écoulement cisailé.

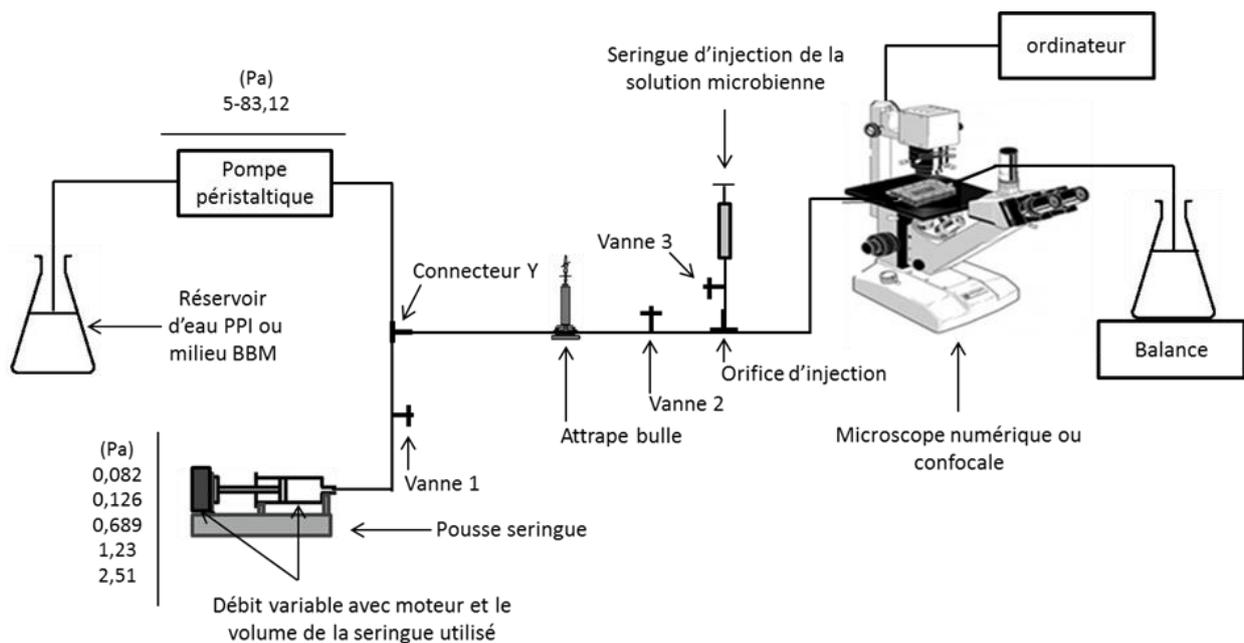


Figure II-13 : Représentation schématique de l'ensemble du dispositif d'évaluation du détachement cellulaire.

L'ensemble des bulles d'air présentes dans le système est ensuite évacué à l'aide de « l'attrape bulle » ou évacué vers le réservoir de sortie. Après cette étape, la vanne 2 est fermée et l'injection de la suspension microbienne préparée selon le protocole décrit dans la section 1.2, est initiée. Les vannes 1 et 2 sont ouvertes et les levures sont laissées en condition statique durant 1h 30 min en prenant garde à l'immobilisation du flux et des cellules dans la chambre à écoulement cisailé. Le réservoir de sortie peut être rempli d'EPPI pour stopper le flux présent dans la chambre. Ce temps d'attente en condition statique correspond aux 30 minutes nécessaires pour la sédimentation des levures plus une heure de temps de contact entre les cellules et le support. Les levures adhérentes à la surface de l'échantillon ont été observées en mode « réflexion », en utilisant le microscope optique Keyence VHX-1000. À l'issue du temps de contact, une photographie est réalisée à l'aide du logiciel VHX 1.3.07 du constructeur. Cette photographie permet de déterminer le nombre initial N_0 de levures adhérentes dans la zone d'observation selon les critères proposés par Guillemot *et al.*, (2006). Les cellules qui sont dénombrées doivent être présentes au début de l'expérimentation, isolées des autres cellules avec une distance voisine de 3 rayons (« parois à parois ») et non bourgeonnante (Guillemot *et al.*, 2006). La mesure du débit Q est effectuée en pesant le fluide recueilli en sortie de circuit. Durant l'expérimentation, le débit Q est augmenté par paliers de 3 minutes, car il a été démontré qu'au-delà de 3 minutes le nombre de levures adhérentes reste constant (Guillemot *et al.*, 2006). Une photographie est réalisée à la fin de l'application de chaque palier pour dénombrer les levures toujours adhérentes à la surface (N) après l'application de la contrainte.

7.3 Correspondance entre les débits appliqués avec le pousse-seringue et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement

D'après l'équation (2) on s'aperçoit que la contrainte de cisaillement appliquée dans la chambre à écoulement ne dépend que du débit Q , les autres paramètres étant constants. Afin de pouvoir obtenir une cinétique de détachement de *C. albicans* débutant avec l'application de contraintes de cisaillement très faibles, il a donc fallu obtenir également des débits très faibles. Au début de l'expérimentation, afin d'obtenir des débits très faibles (48 -960 $\mu\text{L}/\text{min}$), et par conséquent des contraintes de cisaillement très faibles, le débit est amorcé à l'aide du pousse seringue. Le tableau suivant présente la correspondance entre les débits (Q) et les contraintes de cisaillement pariétales appliquées dans la chambre à écoulement cisailé. Le débit maximum

applicable avec le pousse-seringue correspond à 0.960 mL/min et à une contrainte de cisaillement de 0.20 Pa.

mL/s	mL/min	Débit Q	Contrainte de cisaillement pariétale τ_p (Pa)
		m ³ /s	
0.0008	0.048	8.0E-10	0.01
0.004	0.240	4.0E-09	0.05
0.008	0.480	8.0E-09	0.1
0.016	0.960	1.6E-08	0.2

Tableau I-1 : Correspondance entre les débits appliqués avec le pousse-seringue et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement.

7.4 Correspondance entre les débits appliqués avec la pompe péristaltique et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans le canal d'écoulement.

Afin de pouvoir poursuivre la cinétique de détachement de *C. albicans* avec l'application de contraintes de cisaillement plus importante, l'application de débits élevés a été nécessaire. Les débits élevés (24-4000 mL/min) ont été obtenus avec la pompe péristaltique. Le tableau suivant présente la correspondance entre les débits (Q) obtenus avec la pompe péristaltique et les contraintes de cisaillement appliquées dans la chambre à écoulement. Le dernier palier atteint correspond à un débit égal à 400 mL/min, soit une contrainte de cisaillement pariétale de 83 Pa avec un nombre de Reynolds (Re) inférieur à 2000 représentatif d'un écoulement laminaire du fluide.

Niveau pompe péristaltique	Débit Q		Contrainte de cisaillement pariétale τ_p (Pa)
	mL/s	mL/min	
1	0.40	24	4.00E-07
2	0.63	37.8	6.30E-07
3	0.86	51.6	8.60E-07
4	1.10	66	1.10E-06
5	1.33	79.8	1.33E-06
6	1.50	90	1.50E-06
7	1.73	104	1.73E-06
8	1.9	114	1.90E-06
9	2.17	130	2.17E-06

10	2.34	140	2.34E-06	29.25
30	3	180	3.00E-06	37.50
40	4.04	242	4.04E-06	50.50
50	5.08	305	5.08E-06	63.50
60	6.11	367	6.11E-06	76.37
65	6.65	399	6.65E-06	83.12

Tableau I-2 : Correspondance entre les débits appliqués avec la pompe péristaltique et la contrainte de cisaillement pariétale appliquée dans la chambre d'écoulement.

8. Récapitulatif des différentes techniques utilisées selon les surfaces et les protéines

Le tableau ci-dessous présente les différentes méthodes de caractérisation utilisées avec les surfaces de SiO₂ ou des différents nanocomposites et la protéine considérée.

Techniques utilisées durant la thèse	Utilisation ou non des différentes techniques		
	DsRed	SAB	Fn
Gouttelettes déshydratées	✓	✓	✓
Couches minces déshydratées	✓	✓	✓
Mesure de l'angle de contact	✓	✓	✓
Mesures spectrales de couches déshydratées (FTIR)	✓	✓	✓
Mesure des spectres de fluorescence	✓	✗	✗
Etude de l'influence du pH sur l'interaction de gouttelettes protéiques et la silice	✓	✓	✗
Etude AFM	✓	✓	✓
Etude MEB	✓	✓	✓
Etude ellipsométrique des couches minces protéiques déshydratées	✓	✓	✓
Mesures de l'adhésion cellulaire	✗	✓	✓
Etude SERS (spectres RAMAN)	✓	✗	✗
Détachement <i>C. albicans</i>	✗	✓	✓

Figure II-14 : Tableau de synthèse des essais réalisés en fonction des différentes protéines utilisées.

Chapitre III : Détection des changements conformationnels des protéines adsorbées sur des surfaces solides par spectroscopie Raman exaltée

L'adsorption des protéines sur des surfaces solides représente l'étape de conditionnement de la surface influant l'adhésion microbienne et la formation de biofilms et constitue donc un problème fondamental avec des conséquences de Santé publique et économiques. Chaque fois qu'un matériau solide est immergé dans un fluide naturel, l'un des premiers processus inévitable et quasi instantané est l'adsorption des protéines à la surface du matériau. Ce processus dépend de différents facteurs liés à la fois aux propriétés intrinsèques de la protéine et à la surface des matériaux, telles que l'énergie de la surface, hydrophobie/hydrophilie, la charge électrique, la température, le pH, le temps,, etc. (Norde, 2008; Vogler, 2012). L'interaction des protéines et de la surface solide dépend en effet, des forces intramoléculaires présentes au sein des protéines et des propriétés des matériaux. Elle peut induire des changements de la conformation protéique et par conséquent provoquer des différences au niveau de la structure tridimensionnelle des protéines adsorbées. L'adsorption protéique est généralement liée à la cohérence interne des protéines qui peuvent être classées comme « dures » ou « molles » (« hard » ou « soft ») compte tenu de leur stabilité structurelle (Norde and Anusiem, 1992; Norde, 2008). Avec les protéines à forte cohérence interne (les protéines « dures »), les réarrangements structuraux ne contribuent pas de manière significative au processus d'adsorption sur la surface. Au contraire, les protéines possédant une faible cohérence interne (les protéines « molles »), sont susceptibles de s'adsorber même dans des conditions défavorables. En fonction du type de protéines et des changements structuraux résultant de l'adsorption protéique, la fonction de la protéine adsorbée peut également être modifiée. La conformation et la disposition des protéines adsorbées définissent les processus biologiques subséquents et déterminent ainsi la réponse biologique du matériau (Wilson *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2007; Parhi *et al.*, 2010; Vogler, 2012). En participant à l'étape de conditionnement de la surface, l'adsorption protéique influence également les différentes étapes de l'adhésion microbienne sur celle-ci. La connaissance des mécanismes d'adsorption des protéines sur des surfaces solides est donc primordiale. Cependant, les modifications dans les conformations au niveau local ainsi que les mécanismes à l'origine de ces changements conformationnels et les interactions protéines/surface ne sont

pas encore totalement élucidées. Pour ces raisons le développement d'outils de diagnostic, reposant sur des méthodes physiques et permettant la détection des changements conformationnels des protéines adsorbées sur la surface de matériaux solides représente un enjeu scientifique.

Le but de cette étude a donc été de développer une méthode de diagnostic basée sur l'effet SERS qui permet d'identifier les états de conformation des protéines adsorbées et par la suite d'apporter un éclairage et des informations supplémentaires sur les mécanismes d'adsorption protéique sur une surface solide. Ces informations sont apportées par la quantification et l'analyse des changements conformationnels des protéines adsorbées et déshydratées à la surface de substrats plasmoniques contenant un plan d'AgNPs enterrées à une distance nanométrique de la surface. Les résultats de notre étude ont été publiés et sont disponibles dans l'article suivant (Scarangella *et al.*, 2019; annexe C). Cette partie de ma thèse a été réalisée en collaboration étroite avec Adriana Scarangella lors de son post-doctorat au laboratoire LAPLACE. Dans ce qui suit nous ne présenterons qu'une partie des travaux.

1. Choix de la DsRed : propriétés optiques d'une couche protéique adsorbée et déshydratée

Pour cette étude notre choix s'est porté sur la protéine fluorescente DsRed. Les changements conformationnels des molécules de DsRed organisées en monocouche, après adsorption et déshydratation, sur la surface des substrats plasmoniques à base d'AgNPs ont été explorés via la diffusion Raman exaltée de surface (effet SERS). La DsRed est une protéine tétramérique (120 kDa, 4 x 28 kDa) issue d'un corail (*Discosoma*) ayant la propriété intrinsèque d'émettre une fluorescence de couleur rouge. C'est une protéine à forte cohérence interne. Elle appartient à la famille des protéines qui fluorescent naturellement (Fluorescent Protein, FP) et possède une longueur d'onde d'excitation et d'émission en solution de 558 nm et 583 nm, respectivement (Matz *et al.*, 1999; Baird *et al.*, 2000).

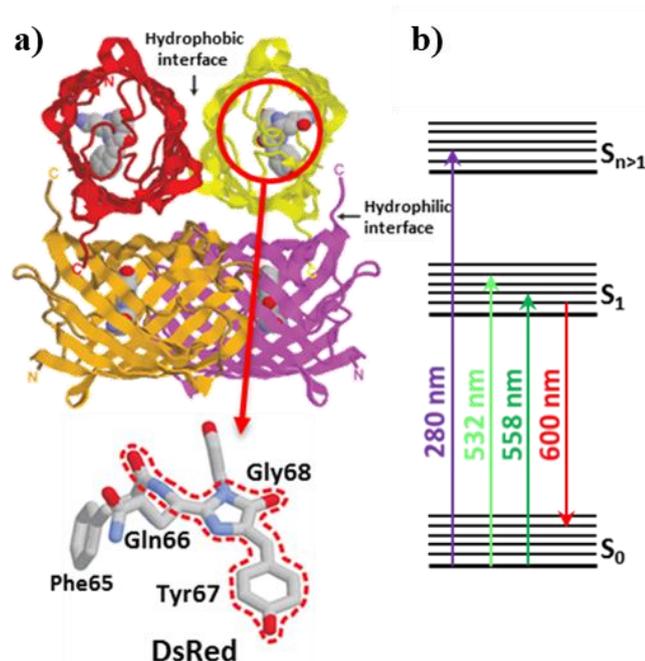


Figure III-1 : (a) Représentation schématique de la protéine fluorescente tétramérique DsRed, de sa structure et (b) principaux niveaux d'énergie électronique de son chromophore.

Comme représenté sur la figure III-1, les monomères de DsRed sont caractérisés par une structure tridimensionnelle en forme de tonneau. Son chromophore, soutenu par une hélice α coaxiale, se trouve rigidement ancré au cœur du tonneau via un réseau de liaisons hydrogène. La structure du chromophore de la DsRed ainsi qu'un schéma de ces principaux niveaux d'énergie sont présentés dans la figure III-1. Il est composé de trois acides aminés (Glycine, Tyrosine et Glutamine, Gln-Tyr-Gly, résidus 66-68). Ces acides aminés sont colorés en rouge dans la séquence peptidique de la DsRed présentée dans la figure III-2.

10	20	30	40	50
MRSSKNVIKE	FMRFKVRMEG	TVNGHEFEIE	GEGEGRPYEG	HNTVKLKVTK
60	70	80	90	100
GGPLPFAWDI	LSPQF QYGS K	VYVKHPADIP	DYKKLSFPEG	FKWERVMNFE
110	120	130	140	150
DGGVVTVTQD	SSLQDGCFIY	KVKFIGVNFP	SDGPVMQKKT	MGWEASTERL
160	170	180	190	200
YPRDGVLKGE	IHKALKLKDG	GHYLVEFKSI	YMAKKPVQLP	GYYYVDSKLD
210	220			
ITSHNEDYTI	VEQYERTEGR	HHLFL		

Figure III-2 : Séquence peptidique de la DsRed (numéro d'accèsion Q9U6Y8 sur [uniprot.org](https://www.uniprot.org/uniprot/Q9U6Y8), <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9U6Y8>). En rouge, est coloré le chromophore de la DsRed composé des trois acides aminés (66Gln-67Tyr-68Gly, QYG).

Cette protéine est utilisée en biologie cellulaire et moléculaire, y compris comme marqueur pour la microscopie à fluorescence, mais également en spectroscopie de corrélation de fluorescence, pour l'identification de cellules par activation de fluorescence, etc. Récemment la DsRed a trouvé une nouvelle application pour le design des photo-commutateurs ultra-stables et réversibles pour une super-résolution en imagerie (El Khatib *et al.*, 2016).

D'un point de vue naturel, l'hypothèse que les protéines fluorescentes originaires des coraux font partie d'un mécanisme adaptatif permettant l'interaction optique et la régulation symbiotique entre les coraux et les algues photosynthétiques (zooxanthelles) a été émise (Field *et al.*, 2006). Il est donc d'un grand intérêt scientifique d'étudier les changements conformationnels qui peuvent affecter la capacité de la DsRed de transmettre de l'énergie par voie optique. Par sa réponse à des sollicitations optiques, la DsRed est un excellent candidat pour le développement des méthodes de diagnostic. Dans le cadre de cette étude, la DsRed étant une protéine fluorescente créée par un corail (*Discosoma*), elle n'a pas été choisie pour son implication dans l'adhésion et la formation du biofilm microbien. Cependant, le choix de cette protéine est justifié par l'utilisation et pour le développement de la méthode de diagnostic utilisé (spectroscopie Raman exaltée par la surface). De plus, la longueur d'onde de l'un des lasers disponibles pour la spectroscopie Raman est proche de la longueur d'onde d'excitation de la DsRed. *In fine* la combinaison de ces différents paramètres a conduit à la sélection de cette protéine afin de permettre l'amplification et la détection des signaux Raman de la DsRed conduisant à des informations sur la structure secondaire de la protéine adsorbée et déshydratée sur la surface.

Le choix de l'utilisation de couches adsorbées et déshydratées est justifié par la possibilité de rencontrer ce type de dépôts dans de nombreux domaines comme le domaine biomédical et industriel (Horbett and Brash, 1987; Carpentier and Cerf, 1993; Barnes *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002; Silva-Bermudez and Rodil, 2013). Dans ces couches, l'organisation des protéines adsorbées et déshydratées peut modifier les propriétés physico-chimiques de la surface et ainsi influencer l'adhésion microbienne.

Il faut souligner que l'étude des changements conformationnels de la DsRed reportés dans la littérature n'a été effectuée qu'avec des chromophores modèles synthétisés chimiquement (He *et al.*, 2002; Tozzini and Giannozzi, 2005; Schleifenbaum *et al.*, 2010). Ces chromophores modèles diffèrent de la protéine DsRed native, utilisée dans le cadre de cette thèse, par l'absence des hélices α et des feuillets β qui entourent naturellement le chromophore et par l'absence des

différentes extensions du système π conjugué. Par ailleurs, aucune information n'est disponible dans la littérature sur les changements conformationnels de la DsRed adsorbée et déshydratée sur une surface solide et soumise à l'excitation par un laser. L'originalité de notre étude repose donc sur l'utilisation de couches minces de DsRed de type native, adsorbée puis déshydratée dans des conditions naturelles de séchage.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés optiques des couches minces de DsRed adsorbées et déshydratées sur un substrat de quartz vierge. Nous avons publié les résultats portant sur les propriétés de photoluminescence (PL) d'une couche nanométrique de DsRed déshydratée dans les deux articles suivants (Soumbo *et al.*, 2016 ;annexe E; Scarangella *et al.*, 2018; annexe D).

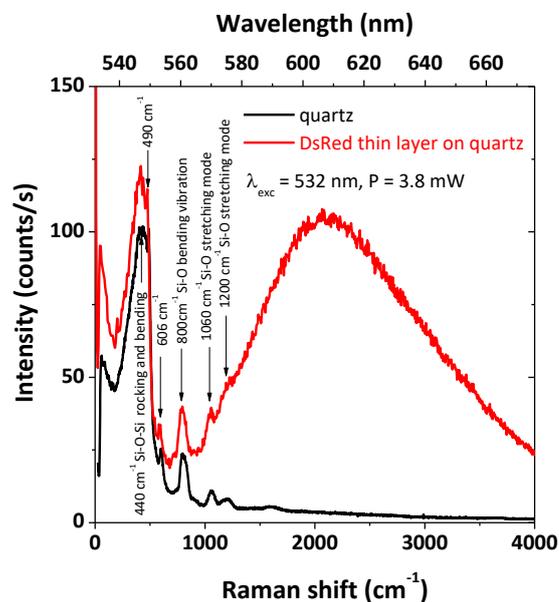


Figure III-3 : Spectres Raman enregistrés sur un substrat de quartz vierge (ligne noire) et sur une couche mince de DsRed adsorbée et déshydratée sur un substrat de quartz (ligne rouge).

La couche mince de DsRed a été élaborée en utilisant le procédé d'enduction par trempage ou « dip coating process ». Pour l'étude de la photoluminescence (PL), la couche de DsRed a été obtenue à partir d'une concentration protéique en solution de 0.1 g l^{-1} (soit 800 nM). Cette couche protéique résultante est mince, discontinue et est composée principalement de monomères de DsRed avec quelques résidus de dimères et de tétramères. Des mesures ellipsométriques ont permis de déterminer que cette couche protéique possède une épaisseur effective de 3.7 nm et couvre 35% de la surface du substrat. La couche de DsRed a été irradiée

avec un laser de 532 nm rentrant en résonance avec la transition S_0 à S_1 du chromophore (Fig. III-1). Sous l'excitation provoquée par le laser, on observe un large signal de PL à environ 600 nm et la présence de pics prononcés à des longueurs d'onde inférieures (Fig. III-3). La bande de PL est attribuée à la recombinaison du niveau S_1 à l'état fondamental S_0 . En dépit de l'émission de PL par la couche mince de DsRed discontinue, aucun signal Raman lié à cette couche n'a été détecté à la surface du substrat en quartz (Fig. III-3). Les seuls pics qui sont visibles en plus sont dus à la diffusion Raman des modes de vibration optique du substrat en quartz (Fig. III-3) (Scott and Porto, 1967). Ce premier résultat confirme donc l'intérêt de la création de substrats plasmoniques afin d'amplifier et de détecter les signatures moléculaires de la couche protéique adsorbée. Nous avons également relevé la PL de la DsRed en fonction de la concentration de la solution initiale dans l'EPPI après déshydratation, à la surface de la silice thermique (SiO_2^{th}) (Fig. III-4). On peut observer que l'intensité de la fluorescence augmente avec la concentration protéique de la solution de DsRed utilisée lors du dépôt des gouttelettes protéiques sur une couche de SiO_2^{th} .

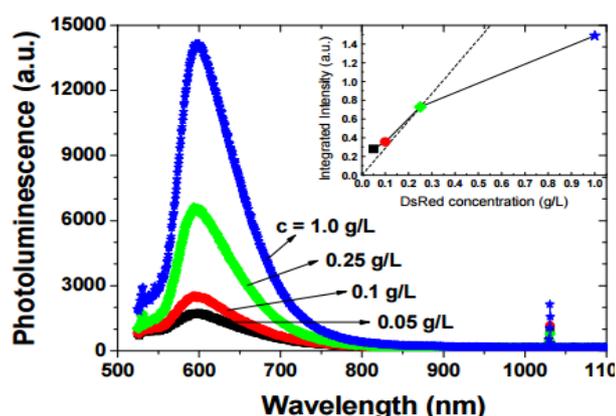


Figure III-4 : Spectres de photoluminescence (PL) de gouttelettes de DsRed déshydratées sur la surface de la silice thermique (SiO_2^{th}) pour différentes concentrations de solutions de DsRed à pH = 7.0 et à 23°C. La figure en insert représente l'intégrale de la fluorescence en fonction des concentrations de DsRed.

Le pic de photoluminescence observé à 600 nm après déshydratation est légèrement supérieur à la valeur trouvée pour la DsRed en solution qui est de 583 nm. Ce décalage entre la PL observable pour la forme en solution et celle mesurée sous forme déshydratée (gouttelettes et couches minces) est très probablement attribuable à des modifications ou réorganisation de la structure protéique après adsorption et déshydratation sur la surface solide. Cependant, l'observation de la forte émission de PL de la couche mince de DsRed après déshydratation indique la conservation du chromophore de la DsRed et l'absence d'une dénaturation complète

de sa structure tertiaire après l'interaction avec les différentes surfaces (quartz et SiO₂th). De plus, la DsRed possède également une forte cohérence interne (protéine « dure ») comme la GFP (Green Fluorescent Protein) une autre protéine fluorescente (FP) possédante environ 23% d'homologie de séquence avec elle (Yarbrough *et al.*, 2001). Cette forte cohérence interne peut également être à l'origine de la conservation de sa structure interne et permet d'éviter une dénaturation complète de la protéine lors du processus d'adsorption et de déshydratation sur la surface. Dans la prochaine section nous allons donc décrire la structure des substrats plasmoniques utilisés afin de détecter les signatures moléculaires de la DsRed adsorbée.

2. Structure et morphologie des substrats plasmoniques à base d'AgNPs enterrées dans SiO₂ élaborés par plasma

Afin d'obtenir l'effet SERS et détecter les signatures moléculaires de la DsRed adsorbée et déshydratée, des substrats plasmoniques à base d'AgNPs ont été utilisés. Comme indiqué dans la figure III-3, sans la présence des AgNPs aucun autre signal Raman à part celui du substrat en quartz n'a été détecté. Pour obtenir une amplification efficace des signaux Raman et utiliser l'effet SERS, nous avons élaboré par procédé plasma des substrats plasmoniques uniformes sur une grande surface et reproductibles, constitués d'une monocouche d'AgNPs enterrées dans une couche de SiO₂^{plasma}. L'architecture des substrats plasmoniques utilisés dans cette étude est présentée dans la figure III-5.

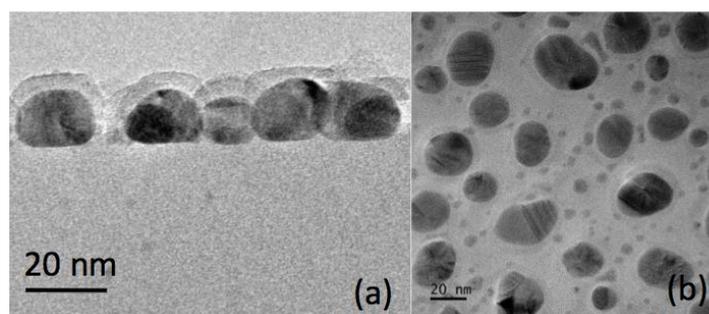


Figure III-5 : (a) Image MET en coupe transversale à champ clair montrant la couche unique d'AgNPs avec sa couche de couverture en silice conforme de 5.5 nm d'épaisseur ; (b) Image MET en vue plane en champ clair des AgNPs.

L'analyse de l'architecture des substrats plasmoniques à base d'AgNPs a été réalisée par microscopie électronique à transmission (MET). À partir des images MET en coupe transversale présentés (Fig. III-5 a), on peut clairement observer que les AgNPs forment une

monocouche plane déposée sur le substrat de quartz. A partir de la section transversale et de la vue en plan des images MET (Fig. III-5 a et b), on peut observer que la plupart des AgNPs ont une forme sphéroïdale prolata. La densité des AgNPs a également été extraite de l'image et a été estimée à 1.7×10^{11} NPs cm^{-2} , ce qui correspond à une superficie de couverture de 42.6% par les AgNPs. Leur distribution est bi-modale. Les plus petites AgNPs possèdent un axe majeur de 5.1 ± 1.7 nm et un axe mineur de 3.9 ± 1.5 nm. Les AgNPs de grande taille possèdent des axes majeur et mineur de 19.9 ± 10.0 nm et 17.0 ± 7.5 nm respectivement. La distance moyenne entre les AgNPs (rebord à rebord) est de 5.2 nm, avec une dispersion allant jusqu'à 3.1 nm (Fig. III-5 b). Le rapprochement des AgNPs permet d'obtenir des points chauds indispensables pour l'amplification des signaux Raman. Les AgNPs sont également recouvertes d'une couche mince de silice plasma ($\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$) de quelques nanomètres d'épaisseur (5.5 nm). On peut observer que cette couche de couverture en $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ recouvre les AgNPs de manière conforme (Fig. III-5 a). L'épaisseur de 5.5 nm de cette couche de couverture est compatible avec le champ proche plasmonique (Zayats and Smolyaninov, 2003) et permet d'obtenir un effet SERS efficace. De plus, cette couche de couverture de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ présente plusieurs avantages. Elle permet premièrement de ne pas exposer directement les AgNPs au milieu environnant et agit comme une couche barrière protégeant les AgNPs contre la corrosion, la disparition rapide et/ou le vieillissement prématuré dus à une oxydation rapide (Benzo *et al.*, 2011). Deuxièmement, elle permet d'éviter le contact direct des protéines avec les AgNPs. Cette séparation permet de limiter l'activité biologique des AgNPs sur les protéines en empêchant, notamment la dénaturation des protéines de DsRed. De plus, en raison de la présence de cette couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ comme espaceur diélectrique entre les AgNPs et les protéines étudiées, le SERS est fourni principalement par le mécanisme électromagnétique (EM), limitant fortement les mécanismes chimiques basés sur le transfert de charge. L'architecture spécifique des substrats plasmoniques utilisés dans cette étude permet l'amélioration de la détection des signatures moléculaires de la DsRed au voisinage des AgNPs avec un facteur de 10^5 en moyenne. En outre, la détection des signaux Raman provenant de couches minces discontinues de DsRed élaborées à partir d'une solution possédant une concentration protéique de 80 nM a été possible. Les résultats obtenus avec ces architectures spécifiques seront explorés dans la section suivante.

3. Interaction de la DsRed avec les substrats plasmoniques à base d'AgNPs et de SiO₂^{plasma}

3.1 Réponse optique de la couche de DsRed adsorbée et déshydratée à la surface des substrats plasmoniques

La réponse optique des substrats plasmoniques à base d'AgNPs a été mesurée à l'aide de spectroscopie optique en transmission dans le domaine de l'UV et du visible (Fig. III-6, courbe bleue). Le pic correspondant à la résonance plasmonique de surface localisée (localized surface plasmon resonance, LSPR) des AgNPs est observable à 454 nm avec une largeur à mi-hauteur (full width at half maximum, FWHM) de 110 nm. Le spectre théorique d'absorption (420 nm) (Fig. III-6, courbe noire) a été calculé en 2D par la méthode des différences finies dans le domaine temporel (FDTD ou finite-difference time-domain) (Lumerical FDTD ink) pour un ensemble infini de nanoparticules ellipsoïdales avec une taille, une forme et une distribution spatiale conformes aux AgNPs utilisées pour l'expérimentation. Le décalage dans le rouge du spectre expérimental observé par rapport au spectre théorique LSPR de l'ensemble des AgNPs dans la silice, est provoqué par la forme allongée des AgNPs et leur interaction électromagnétique (EM) mutuelle (Kreibig and Vollmer, 1995; Coronado and Schatz, 2003).

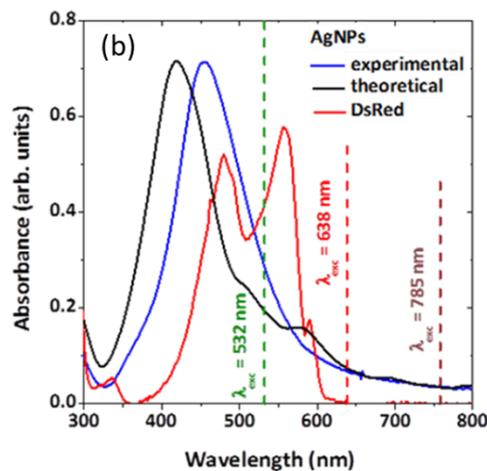


Figure III-6 : Spectre d'absorption du substrat plasmonique à base d'AgNPs, expérimental (ligne bleue) et théorique (ligne noire), et de la protéine de DsRed (ligne rouge).

Dans la figure III-6 on s'aperçoit également que la résonance plasmonique des substrats utilisés (courbe bleue) et la bande d'absorption de la DsRed (courbe rouge) se superposent. Ce recouvrement des bandes permet d'obtenir une amélioration supplémentaire, par le biais de

l'effet SERS résonant, des conditions nécessaires afin de détecter les signatures moléculaires de la DsRed.

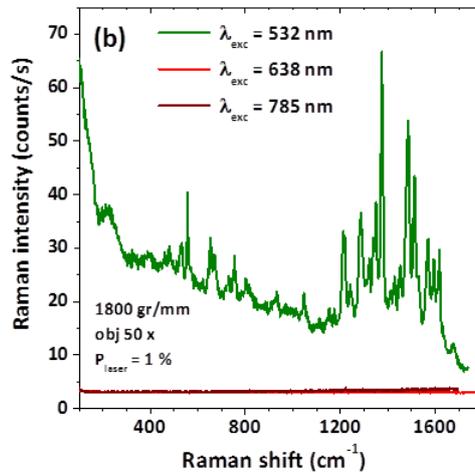


Figure III-7 : Spectres Raman enregistrés sur une couche mince de DsRed adsorbée et déshydratée sur la surface du substrat plasmonique à base d'AgNPs pour différentes longueurs d'onde d'excitation.

Pour confirmer la présence d'un effet SERS efficace, les échantillons ont été excités à trois longueurs d'onde différentes : 532, 638 et 785 nm (Fig. III-7). Les pics Raman sont clairement observables avec la longueur d'onde d'excitation la plus faible (532 nm) (Fig. III-7, courbe en vert), c'est-à-dire celle qui est en résonance avec la bande d'absorption des AgNPs et la bande d'absorption de la DsRed. De plus, comme indiqué précédemment, sans AgNPs aucun signal Raman provenant des couches de DsRed adhérentes n'a pu être détecté (Fig. III-3). Ce résultat est resté identique même pour la couche élaborée avec la plus forte concentration protéique en solution (800 nM).

Bien que 80 nM soit la plus faible concentration protéique utilisée afin d'élaborer la couche protéique, cette concentration ne peut être définie comme la limite de détection la plus basse. La possibilité de détecter un signal Raman très intense à partir de protéines déposées à cette concentration suggère que la concentration pourrait être encore diminuée avant d'atteindre la limite basse de détection.

Au cours des expériences, nous avons systématiquement observé de fortes fluctuations des intensités de la diffusion Raman. Les spectres Raman absents où de très faibles intensités pouvaient soudainement devenir très intenses. Ce phénomène connu sous le nom de « clignotement SERS » (Mezni *et al.*, 2014) est typique de la diffusion Raman d'un petit nombre de molécules situées à des points chauds plasmoniques. Il est généralement observé avec une seule molécule lors des expérimentations SERS (Sonntag *et al.*, 2012; Wang Yuling

and Irudayaraj Joseph, 2013). A cause de ces fluctuations, l'intensité des pics SERS est très difficile à estimer avec précision. Avec la présence de ce phénomène, l'établissement de la moyenne temporelle peut mener à des valeurs aléatoires de l'intensité des pics SERS selon la période d'apparition et la durée des fluctuations. Pour cette raison nous avons réalisé une identification des pics Raman mesurés en fonction de leur correspondance fréquentielle.

3.2 Attribution des pics SERS des molécules de DsRed adsorbées et déshydratées sur les substrats plasmoniques à base d'AgNPs

Dans la littérature, la diffusion Raman des propriétés de la DsRed dans son état natif n'a pas été explorée. Les calculs de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) des propriétés de diffusion électronique et Raman ont été réalisés uniquement pour des chromophores modèles de la DsRed (Tozzini and Giannozzi, 2005) et les spectres Raman calculés ont été comparés à ceux mesurés sous une excitation non résonnante (752 nm), à partir de chromophores de la DsRed synthétisés chimiquement en solution (He *et al.*, 2002). Cependant, la structure du chromophore modèle est légèrement différente de celle de la protéine DsRed native. Cette différence entraîne une excitation et une émission décalées ainsi que des rendements quantiques optiques beaucoup plus faibles (He *et al.*, 2002).

Dans le but d'affecter les pics Raman mesurés aux modes de vibration des protéines, nous avons effectué des calculs basés sur la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) qui permet de prédire les modes propres de vibration des protéines. Les calculs DFT effectués utilisent la modulation de la polarisabilité moléculaire qui est appropriée seulement pour les expériences de diffusion Raman non résonnante. Ces calculs ne tiennent pas compte de l'effet de résonance plasmonique, et ne peuvent donc pas prédire les intensités des pics SERS. De plus, en raison du « clignotement SERS », l'intensité des spectres Raman fluctue fortement. Ces fluctuations sont une autre raison expliquant le décalage entre les intensités SERS mesurées et les signatures moléculaires calculées par DFT. Néanmoins, les calculs DFT sont très utiles pour l'affectation des pics Raman observés, basés sur leurs fréquences vibratoires (Le Ru and Etchegoin, 2012; Mezni *et al.*, 2014). Dans les calculs de DFT effectués, nous avons donc considéré trois configurations moléculaires différentes du chromophore de la DsRed (configuration A, B et C) qui minimisent l'énergie (Fig. III-8).

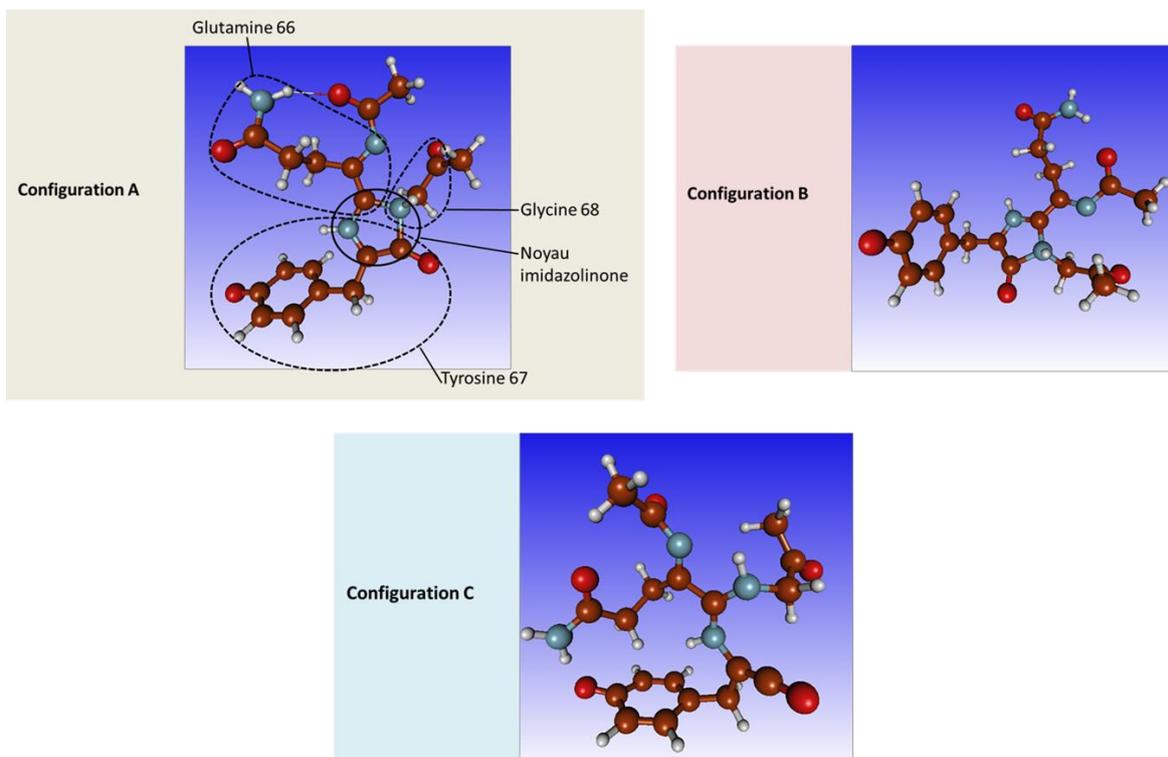


Figure III-8 : Représentation des trois différentes configurations (A, B et C) du chromophore de la DsRed. Les acides aminés formant le chromophore de la DsRed ont été reporté sur la configuration A.

La configuration A possède une énergie minimale de -1332.6434 Ha. Dans cette configuration l'anneau phénolique porté par la tyrosine 67 (67Tyr) se situe pratiquement dans le même plan que le noyau imidazolinone formé par la glycine 68 (68Gly) et cette même 67Tyr. La configuration B a une énergie minimale de -1332.6511 Ha, soit 0.2 eV de moins que l'énergie de la configuration A. Elle diffère de la configuration A par le positionnement perpendiculaire du phénol par rapport à l'imidazolinone. Dans la configuration C, la liaison C=N du cycle imidazolinone est cassée, altérant ainsi complètement la structure du chromophore. Cette configuration possède une énergie minimale de -1332.6689 Ha, soit 0.68 eV de moins que la configuration A. En comparant les spectres Raman calculés pour les configurations A, B et C, on peut ainsi comprendre comment les changements de conformation de la protéine s'effectuent et décrire l'impact de ces changements sur les pics Raman donnant lieu au phénomène de « clignotement SERS » lors de l'expérimentation. En raison du fort « clignotement » du signal Raman évoqué précédemment, l'affectation des pics Raman observés suite à l'effet SERS est complexe. Par conséquent, pour extraire les tendances générales à partir des signatures Raman de la protéine, nous avons analysé un nombre important de spectres Raman expérimentaux acquis (plus de 300 spectres Raman) à partir des molécules

de DsRed situées en différents points à la surface de l'échantillon. Les spectres présentés dans cette étude sont représentatifs de chacune des différentes configurations simulées. Nous pouvons affirmer que 70% des données sont totalement affectables à l'une des trois configurations simulées. Les 30 % de spectres restants ne sont pas entièrement attribuables à l'une ou à l'autre des trois configurations pour les raisons suivantes : (i) le signal Raman n'est pas observable dans tous les points scannés. Ceci est dû au fait que les couches protéiques de DsRed sont discontinues, même pour la couche élaborée avec la plus forte concentration protéique en solution (0.1 g l^{-1} , 800 nM). La surface des échantillons possédant alors des espaces sans protéine, seul le signal d'arrière-plan des AgNPs, pris comme référence, a été détecté. (ii) dans un nombre limité de points analysés nous avons observé la coprésence de différentes configurations. Ces spectres n'ont pas été considérés du fait de l'impossibilité de les affecter clairement à une des trois configurations.

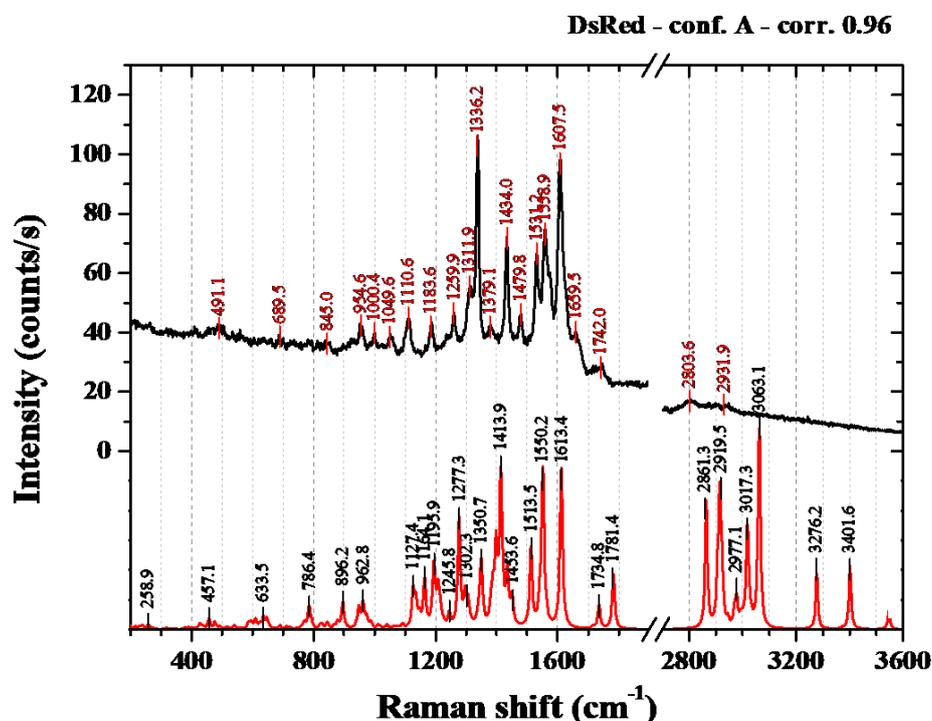


Figure III-9 : Spectre SERS de la couche protéique déshydratée de DsRed déposée à partir d'une solution dont la concentration protéique est de 0.05 g l^{-1} (400 nM) (ligne noire) et spectre Raman simulé par DFT du chromophore de la DsRed dans la configuration A (ligne rouge). Les pics Raman identifiés sont également présentés.

La comparaison entre le spectre SERS expérimental obtenu à partir de la couche déshydratée de DsRed (0.05 g l^{-1} (400 nM)) et du spectre Raman simulé par DFT du chromophore de la DsRed dans la configuration A est présentée dans la figure III-9. Bien que la comparaison des autres spectres expérimentaux avec les configurations B et C ait également été effectuée, dans ce chapitre nous nous intéresserons plus particulièrement à l'affectation des

pics de la configuration A dans le but de démontrer la puissance de la méthode de diagnostic développée. Plus de détails sur l'affectation des autres configurations peuvent être retrouvés dans notre article (annexe C). Concernant le spectre obtenu avec la configuration A, trois différentes régions spectrales, 200-1000 cm^{-1} , 1000-1800 cm^{-1} , et 2700-3500 cm^{-1} , sont identifiables (Fig. III-9). Tous les pics Raman observés en dessous de 1000 cm^{-1} font partie des caractéristiques angulaires (dans et hors du plan) des déformations de l'imidazolinone et de l'anneau phénolique portés par les trois acides aminés (Gln-Tyr-Gly) qui composent le chromophore de la DsRed et correspondent également aux vibrations de la protéine entière (Stewart and Fredericks, 1999; Gelder *et al.*, 2007). Cette attribution a été rapportée dans les articles présentant les propriétés de diffusion Raman de la protéine GFP (Tozzini and Nifosì, 2001). La présence de l'acide aminé glycine (Gly) a des conséquences importantes pour l'ensemble de la chaîne polypeptidique et la structure des protéines de DsRed. En raison de l'absence de groupement chimique significatif, la glycine possède une réactivité chimique intrinsèque faible. Ainsi, l'absence d'une grande chaîne latérale peut se traduire par une flexibilité conformationnelle des liaisons N-C et C-C dans la chaîne polypeptidique (Peters, 2005). Par conséquent, cette région spectrale des spectres Raman contient des informations sur la structure secondaire de la DsRed. La gamme spectrale 1000-1800 cm^{-1} , où les caractéristiques Raman les plus intenses sont observées, est corrélée aux modes de vibration du phénol et de l'imidazolinone ainsi qu'aux vibrations de l'étirement de la double liaison C=C (1500-1800 cm^{-1}). Les pics Raman peu visibles dans la gamme de 2800-3500 cm^{-1} sont liés aux modes d'étirement du C-H, de N-H et O-H. Ils sont particulièrement sensibles à l'environnement chimique de la molécule du fait de la réactivité de l'atome d'hydrogène (Tozzini and Nifosì, 2001).

Bien que la plupart des pics Raman observés suite à l'effet SERS correspondent aux chromophores du modèle de DsRed, des pics Raman supplémentaires ne peuvent pas être attribués à ce dernier, quelle que soit la configuration prise en compte par les simulations DFT. Ces pics Raman supplémentaires peuvent être liés à la structure secondaire de la protéine, qui n'est pas en résonance avec la longueur d'onde d'excitation utilisée. Plus précisément, le pic à environ 1660 cm^{-1} , bien visible dans le spectre protéique de la figure III-9, peut être attribué aux modes de vibration de l'amide I de la protéine (caractéristique de la structure secondaire adoptée par la protéine, provenant principalement des hélices α de la protéine), comme cela a déjà été signalé pour la GFP (Bell *et al.*, 2000). Ces données sont en accord avec l'analyse des données infrarouges par transformée de Fourier effectuée sur les mêmes couches protéiques de DsRed déshydratées lors d'une de nos études précédentes (Soumbo *et al.*, 2016; annexe E;

Scarangella *et al.*, 2018; annexe D). Le pic à 1050 cm^{-1} peut être attribué au mode de vibration des chaînes latérales aromatiques de la protéine, tandis que les pics supplémentaires plus faibles de l'ordre de $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ peuvent être reliés à l'amide III de la protéine (Bell *et al.*, 2000). Enfin, le pic observé à 1530 cm^{-1} a des contributions provenant de la bande amide II des protéines (Soumbo *et al.*, 2016; annexe E; Scarangella *et al.*, 2018; annexe D) bien qu'il semble plus large et se soit déplacé vers des nombres d'ondes plus élevés par rapport à l'étirement C=N de l'anneau imidazolinone (1513 cm^{-1}) sur le spectre simulé par DFT.

3.3 Changements conformationnels et évolution temporelle de la DsRed adhéree sur les substrats plasmoniques à base d'AgNPs

Dans cette section, la distribution des différentes configurations de la DsRed adsorbée et déshydratée a été analysée en fonction de la concentration protéique utilisée lors de l'élaboration des couches minces protéiques. La figure III-10 présente les spectres expérimentaux et simulés les plus fréquemment observés avec les couches élaborées en utilisant les solutions protéiques de concentration égale à : 0.01 g.l^{-1} (80 nM), 0.05 g.l^{-1} (400 nM), et 0.1 g.l^{-1} (800 nM). Sur cette figure est également représenté en insert le pourcentage des différents types de configuration rencontrés en fonction des couches protéiques analysées. On observe que les apports des différentes configurations évoluent avec l'augmentation de la concentration en DsRed utilisée lors de l'élaboration des couches protéiques. Pour la plus faible concentration en DsRed (80 nM), les protéines adhérees sur la surface prédominent significativement dans la configuration B (72 %) (Fig. III-10 (2) (a)).

(1)

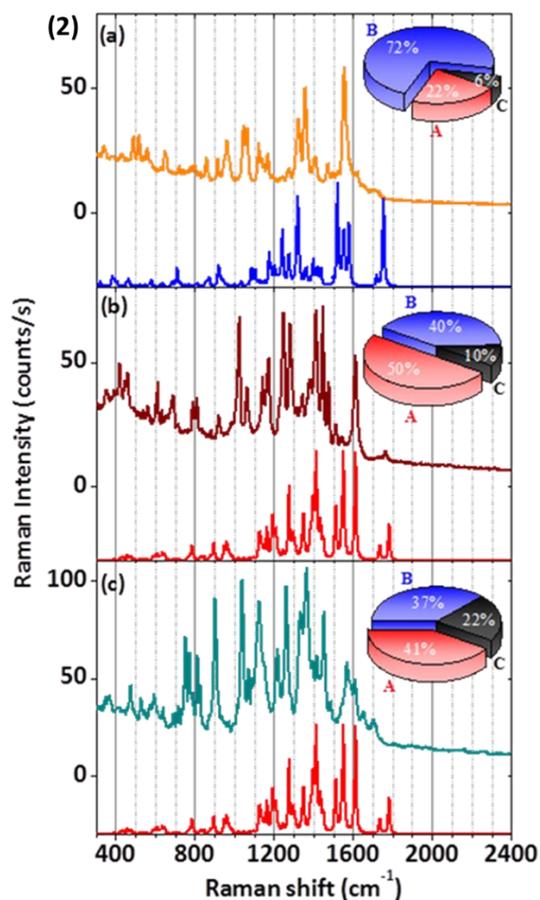
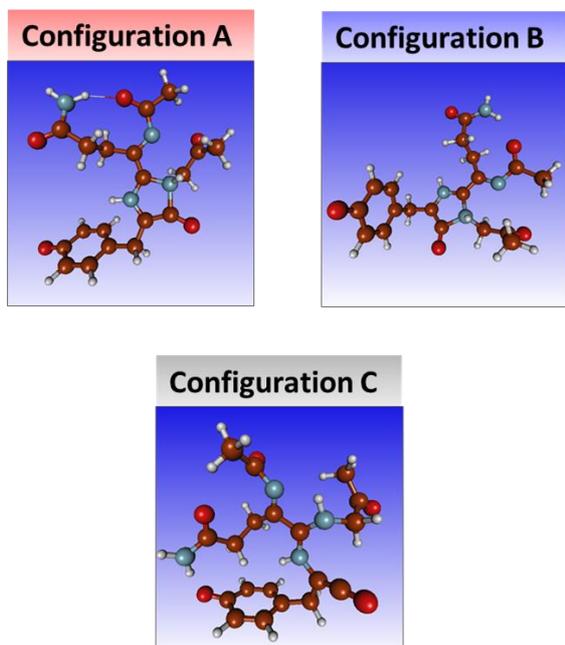


Figure III-10 : (1) Représentation des trois configurations (A, B et C) du chromophore de la DsRed. (2) Spectres SERS expérimentaux (spectres supérieurs) et spectres Raman simulés par DFT (spectres inférieurs) des couches déshydratées de DsRed élaborées à partir d'une solution contenant (a) 0.01 g l⁻¹ (80 nM), (b) 0.05 g l⁻¹ (400 nM) et (c) 0.1 g l⁻¹ (800 nM) de DsRed. Les spectres Raman ont été enregistrés avec un temps d'accumulation de 30 s. Les diagrammes à secteurs représentant la répartition de la population des configurations A, B et C, sont rapportés dans les encarts pour chaque concentration protéique.

Avec les couches protéiques élaborées à partir d'une concentration supérieure à 0.05 g.l⁻¹ la DsRed se stabilise sur la surface principalement dans les configurations A et B, avec une majorité de configuration A (configuration A =50%, configuration B = 40 %, configuration C = 10 % (Fig. III-10 (2) (b)). Globalement, lorsque l'on augmente la concentration protéique des solutions utilisées pour l'élaboration des couches, la proportion de protéines possédant la configuration C augmente parallèlement (de 6 % à 22 %). Cette augmentation pourrait être due à la présence de différents mécanismes d'interaction photo-induits entre les molécules de DsRed et le substrat plasmonique pendant le processus d'adsorption et de déshydratation. En effet, pour la couche protéique élaborée avec la concentration la plus faible, le signal est

probablement donné par des molécules isolées de DsRed. En revanche, pour les couches de DsRed déposées à des concentrations plus élevées, le signal peut provenir de la DsRed sous forme de monomères et de tétramères ou encore de monomères et/ou de dimères proches. Les différentes morphologies des couches protéiques peuvent également expliquer les différentes populations de chromophores détectées grâce au signal SERS. En effet, la présence de monomères, de dimères ou encore de tétramères conditionnés sur la surface plasmonique peut entraîner des interactions photo-induites plus fortes mais également une absorption optique plus importante et de ce fait une augmentation des modifications conformationnelles des protéines.

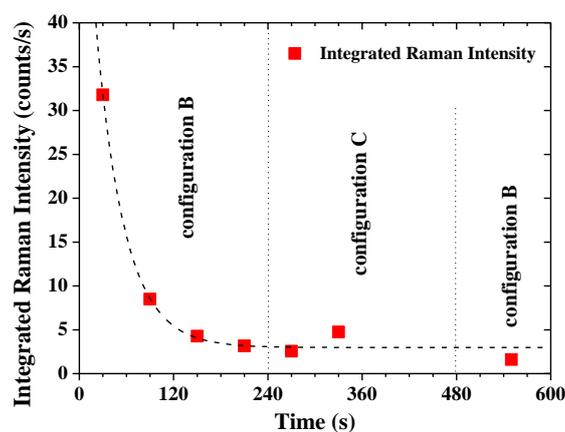


Figure III-11 : Evolution temporelle des intensités des spectres Raman intégrées après soustraction du signal de fond. Les spectres ont été acquis avec un temps d'accumulation de 30 s. Les mesures ont été effectuées avec la couche mince de DsRed élaborée à partir d'une solution de DsRed de concentration égale à 0.1 g l^{-1} (800 nM).

Pour compléter notre analyse nous avons également étudié l'évolution temporelle de l'intensité SERS des molécules de DsRed durant quelques minutes. En effet, les fluctuations conformationnelles des molécules de DsRed et/ou des processus chimiques modifiant leur structure moléculaire peuvent être à l'origine du « clignotement » du signal Raman. Dans la figure III-11 est présentée l'évolution temporelle de l'intégration spectrale des différentes intensités Raman après soustraction du bruit de fond. On observe que l'intensité Raman subit une forte réduction (divisée par quatre environ) pendant les 60 premières secondes. L'évolution transitoire est ensuite suivie d'une stabilisation de la DsRed dans la configuration B. Au cours des quatre minutes suivantes, les spectres Raman observés indiquent une stabilisation dans la configuration C, suivie d'un retour à la configuration initiale (configuration B). Ces résultats confirment donc bien le caractère dynamique de l'interaction entre le faisceau laser et les protéines adsorbées sur les surfaces plasmoniques. En effet, sous l'irradiation du laser, les

molécules de DsRed subissent des modifications structurelles entraînant des modifications temporaires ou permanentes de leurs conformation, ce qui provoque des fluctuations de leurs signatures Raman et donc le phénomène de « clignotement SERS ».

4. Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié par l'intermédiaire de l'effet SERS, des couches minces de DsRed déshydratées après adsorption sur la surface des substrats plasmoniques. Afin de détecter la signature moléculaire des protéines, des substrats plasmoniques à base d'AgNPs ont été réalisés par un procédé de dépôt par plasma. Dans ce procédé, la monocouche d'AgNPs est élaborée par pulvérisation cathodique d'une cible d'argent et le recouvrement des AgNPs par une couche de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ est effectué par polymérisation plasma. Cette monocouche d'AgNPs est responsable de l'effet plasmonique des différents nanocomposites.

Les changements conformationnels de la DsRed ont été détecté uniquement en présence des AgNPs ce qui montre le rôle indispensable de l'effet SERS. La couche de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ permet d'éviter le contact direct des protéines avec la surface active d'AgNPs (i.e. chimisorption) et maximise le mécanisme de l'effet SERS basé sur la résonance plasmonique. Les systèmes plasmoniques ont été couplés à la DsRed sous forme de couches minces protéiques déshydratées après adsorption. Ces couches minces protéiques et discontinues ont été élaborées à partir de solutions de DsRed de concentrations comprises entre 80 à 800 nM.

Trois conformations différentes de la DsRed ont pu être identifiées. Les informations recueillies ont permis de révéler que la structure du chromophore de la DsRed adsorbée subit des transformations optiques et chimiques assistées lors de l'interaction avec le faisceau optique, ce qui conduit à des transitions réversibles entre les trois conformations. Dans la gamme spectrale située entre $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ ce sont les pics Raman les plus intenses et principalement corrélés avec la structure du chromophore de la DsRed qui ont été observés. Les informations sur la structure secondaire de la DsRed ont été retrouvées dans la région spectrale de $200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. La gamme spectrale située entre $2800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ était particulièrement sensible à l'environnement chimique du chromophore de la DsRed, c'est-à-dire à la structure primaire et secondaire de la DsRed, en raison de la réactivité de l'atome d'hydrogène. L'évolution temporelle de l'intensité SERS de la DsRed sur une échelle de quelques minutes a également été étudiée. Sous l'irradiation du laser, les molécules de DsRed peuvent subir des

transformations chimiques optiquement assistées. Ces transformations se traduisent par des modifications structurelles et par la stabilisation temporaire ou permanente dans les différentes conformations, avec une possibilité de retour dans la conformation initiale. Ce mécanisme est en partie responsable des fluctuations observées. Il est à l'origine du « clignotement SERS ». Les résultats de cette étude révèlent qu'en interaction avec la surface solide d'un matériau, la structure d'une protéine à forte cohérence interne (protéine « dure ») est essentiellement préservée, même si certaines altérations peuvent être observées. Ils appuient le caractère dynamique de l'interaction entre les protéines, le faisceau laser et les surfaces plasmoniques.

Chapitre IV : Analyses des propriétés de protéines adsorbées sur des couches minces nanocomposites

Au cours de ces dix dernières années, la recherche et le développement de nouveaux biomatériaux à base d'oxyde de silicium a considérablement augmenté. Le dioxyde de silicium ou silice (SiO_2) est un matériau inorganique bien connu pour ses propriétés optiquement transparentes dans le domaine visible du spectre. Il possède également des propriétés hydrophiles très prononcées. De plus, lorsque les couches minces de SiO_2 sont correctement dimensionnées, elles peuvent être utilisées pour leurs propriétés antireflet permettant la détection de substances chimiques sur leurs surfaces. L'intérêt pour les couches minces de SiO_2 réside dans leur large utilisation en plasmonique comme matrice hôte, en microélectronique en tant que barrière de diffusion ou en tant qu'isolant électrique mince, etc. (Irene, 1985; Lacy *et al.*, 1996b; Carles *et al.*, 2011; Pugliara *et al.*, 2015). De plus dans le domaine biomédical, elles sont utilisées dans la conception de biomatériaux dans des applications bien établies : les revêtements antibactériens d'implants orthopédiques et dentaires, etc (Vo-Dinh, 2005; Chudakov *et al.*, 2010; Kozai *et al.*, 2012). Cependant, bien que de nombreuses études aient été consacrées à l'exploration de la biocompatibilité des oxydes de silicium *in vitro* et *in vivo*, les résultats présentés sur les propriétés physico-chimiques qui influencent leur biocompatibilité restent limités. Une éventuelle application dans des dispositifs bioélectroniques et dans des biocapteurs demande une compréhension plus approfondie des propriétés physico-chimiques et des principes de base des interactions complexes entre le matériau et les systèmes biologiques. La conformation et la disposition des protéines adsorbées peuvent influencer les processus biologiques subséquents et déterminer ainsi la réponse biologique au matériau (Newman *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2007; Parhi *et al.*, 2010; Vogler, 2012). L'adsorption protéique dépend de différents facteurs liés à la fois aux propriétés intrinsèques de la protéine et de la surface solide (Norde, 2008; Vogler, 2012).

Dans ce chapitre, nous rapportons les résultats de l'interaction de trois différents types de protéines déshydratées après adsorption à la surface de différentes couches minces de SiO_2 et de nanocomposites. Pour comprendre les forces motrices impliquées dans l'adsorption protéique, nous avons utilisé la SAB, la Fn et la DsRed. La SAB a été choisie car c'est une protéine modèle bien connue (Sinibaldi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013; Pellicane and Cavero, 2013; Liu *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2017). La Fibronectine est connue pour promouvoir l'adhésion

cellulaire, notamment celle de *C. albicans* (Bendel and Hostetter, 1993; Nègre *et al.*, 1994; Modrzewska and Kurnatowski, 2015; Nett *et al.*, 2016). La troisième, la DsRed (protéine « dure ») est produite par un corail ; elle a été sélectionnée du fait de sa propriété intrinsèque de fluorescence dans le rouge. Dans la littérature, on peut également souligner que la plupart des méthodes de diagnostic appliquées sont adaptées à l'étude de la stabilité structurale des protéines en solution. Dans notre cas, nous avons utilisé soit différentes couches minces protéiques déshydratées après adsorption des protéines, soit des gouttelettes protéiques déposées sur le substrat. En effet, ces différentes configurations de dépôts protéiques peuvent être rencontrées dans l'industrie ou le domaine biomédical et se retrouvent ainsi à l'origine de problème de santé majeure (Horbett and Brash, 1987; Carpentier and Cerf, 1993; Barnes *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002; Silva-Bermudez and Rodil, 2013).

1. Étude de l'interaction de gouttelettes protéiques (DsRed, SAB et Fn) avec une couche mince de SiO₂th

1.1 Adsorption et propriétés optiques des gouttelettes sessiles de DsRed, de SAB et de Fn

Dans cette section, on s'intéressera à l'adsorption et aux propriétés optiques de gouttelettes de DsRed, de SAB et de Fn à différentes concentrations et déposées à la surface d'une couche mince de SiO₂th. L'élaboration des couches SiO₂th suit la procédure décrite dans le Chapitre 2 qui consiste à oxyder sous atmosphère contrôlée des plaquettes de Si. L'épaisseur des couches SiO₂th utilisées est de 80 nm. Avant chaque utilisation les couches SiO₂th ont été nettoyées selon le protocole décrit au Chapitre 2. Une partie des résultats présentés dans ce Chapitre a été publiée dans les articles suivants (Soumbo *et al.*, 2016; annexe E; Scarangella *et al.*, 2018; annexe D).

Pour répondre aux différents objectifs plusieurs mesures distinctes ont été effectuées en sélectionnant une gamme de concentrations protéiques de 0.01-5.0 g/L. L'interaction des protéines avec les surfaces de SiO₂th a été analysée sur la base de gouttelettes de solutions protéiques ($3.8 \pm 0.1 \mu\text{l}$) mises en contact avec la couche mince de SiO₂th. Le processus de déshydratation a été caractérisé en mesurant l'angle de contact au cours du temps. Le Tableau IV-1 présente les mesures des angles de contact réalisées à t_{1s} (temps $t = 1$ s) et jusqu'à la déshydratation complète des gouttelettes d'EPPI (contrôle), de DsRed ($c = 0.05$ g/L), de SAB

($c = 0.05 \text{ g/L}$) et de Fn ($c = 0.05 \text{ g/L}$). Avec l'EPPI seul, on obtient un angle de contact ($t_{1s}, \theta_A = 58.1^\circ \pm 1.60^\circ$) inférieur à 90° confirmant le caractère hydrophile de la couche mince de SiO_2^{th} . Avec une concentration protéique de 0.05 g/L , on observe une légère augmentation de l'angle de contact avec la solution de SAB ($t_{1s}, \theta_A = 60.2^\circ \pm 1.80^\circ$) et la solution de Fn ($t_{1s}, \theta_A = 60.1^\circ \pm 0.33^\circ$). Dans ces mêmes conditions, l'angle de contact obtenu avec la DsRed est plus grand ($t_{1s}, \theta_A = 65.43^\circ \pm 0.90^\circ$).

Θ_A^a	Θ_R^b	Θ_R	Θ_R	Θ_R	Θ_R
t=1s ^c	t=1min	t=5min	t=10min	t=15min	t=18min
Gouttelettes d'eau PPI (Solution contrôle), pH=7.0 and 23°C					
					
$58.1^\circ \pm 1.60^\circ$	$53.1^\circ \pm 1.26^\circ$	$48.1^\circ \pm 1.31^\circ$	$46.2^\circ \pm 0.30^\circ$	$44.3^\circ \pm 0.82^\circ$	0°
Gouttelettes de DsRed avec $c = 0.05 \text{ g/L}$, pH=7.0 et 23°C					
					
$65.40^\circ \pm 0.90^\circ$	$60.09^\circ \pm 0.80^\circ$	$40.03^\circ \pm 1.30^\circ$	$5^\circ \pm 2.30^\circ$	0°	
Gouttelettes de BSA avec $c = 0.05 \text{ g/L}$, pH=7.0 et 23°C					
					
$60.2^\circ \pm 1.80^\circ$	$55.9^\circ \pm 0.70^\circ$	$40.2^\circ \pm 1.1^\circ$	$24.0^\circ \pm 0.60^\circ$	$6.6^\circ \pm 1.50^\circ$	0°
Gouttelettes de Fn avec $c = 0.05 \text{ g/L}$, pH=7.0 et 23°C					
					
$60.1^\circ \pm 0.33^\circ$	$52.3^\circ \pm 0.72^\circ$	$41.2^\circ \pm 0.57^\circ$	$23.4^\circ \pm 0.47^\circ$	$6.4^\circ \pm 0.28^\circ$	0°

Tableau IV-1 : Suivi dynamique de la déshydratation de différentes gouttelettes protéiques par mesure des angles de contact en fonction du temps à 23°C (moyenne \pm ET, $n=3$).

Cette augmentation de l'angle de contact à t_{1s} avec les solutions protéiques comparées à l'EPPI signe l'adsorption des protéines sur la couche mince de SiO_2^{th} avec l'orientation des chaînes polaires de la protéine vers la surface apolaire de la SiO_2^{th} . La comparaison des différents processus mis en jeu entre une gouttelette d'eau et une gouttelette protéique est présentée dans la figure IV-1. Si l'on s'intéresse aux angles de contact mesurés durant le processus de déshydratation de l'EPPI (figure IV-1(a)), on observe le phénomène d'hystérésis de l'angle de contact. En effet, on note une conservation de l'angle de contact durant le processus de déshydratation ($t_{1-15\text{min}}, \theta_A = 53.1^\circ$ à 44.3°). En comparaison, les gouttelettes protéiques induisent une diminution marquée de l'angle de contact au cours du processus de déshydratation (exemple SAB : $t_{1-15\text{min}}, \theta_A = 60^\circ$ à 5° , figure IV-1(b)). L'adsorption des protéines sur la surface de SiO_2^{th} entraîne la fixation des points de contact entre la gouttelette, l'air et la surface de la SiO_2^{th} (figure IV-1(b)). Les points de contact entre la gouttelette protéique et la surface se retrouvent alors « épinglés ». En conséquence, au fur et à mesure de

l'évaporation, les gouttelettes protéiques se déshydratent sans pouvoir déplacer leurs points de contact avec la surface, ce qui entraîne une diminution plus importante de l'angle de contact mesuré (Fig. IV-1(b)).

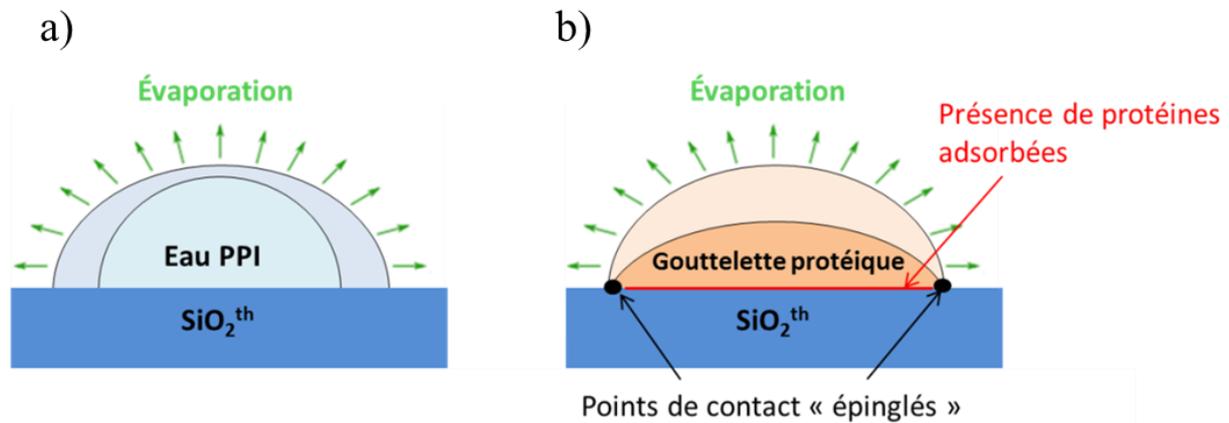


Figure IV-1 : Représentation schématique du processus de déshydratation pour : (a) une gouttelette d'eau ou (b) une gouttelette protéique déposée à la surface d'une couche mince de SiO₂th. Le volume d'eau évaporé est représenté par une couleur pâle.

Le Tableau IV-2 présente les mesures des angles de contact pour une gamme de concentrations protéiques allant de 0.01 à 5 g/L (1s après le dépôt). En accord avec les observations précédentes, l'adsorption des protéines sur la SiO₂th réduit la mouillabilité (t_{1s} , $\theta_A > 59.8^\circ$) des gouttelettes protéiques comparées à la solution contrôle (t_{1s} , $\theta_A = 58.1^\circ$). Du fait du caractère hydrophile de la couche mince de SiO₂th, les mesures des angles de contact obtenus avec les solutions protéiques sont comprises entre $59.8^\circ \pm 1.6^\circ$ et $81.30^\circ \pm 0.87^\circ$. On observe une augmentation des angles de contact (t_{1s}) avec l'augmentation des concentrations protéiques.

Gouttelettes protéiques g/L	DsRed		BSA		Fibronectine plasmatique humaine	
	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A
0.01	n/a	n/a		59.8° ±1.6°		59.9° ±0.25°
0.05		65.40° ±0.90°		60.2° ±1.8°		60.1° ±0.3°
0.1		65.50° ±1.7°		63.0° ±1.3°		62.6° ±1.7°
0.25		73.70° ±0.97°		63.7° ±0.52°		70.7° ±0.97°
0.5	n/a	n/a		64.0° ±0.50°		71.8° ±2.7°
1		72°.00 ±2.30°		65.35° ±2.6°		81.3° ±0.87°
5	n/a	n/a		66° ±0.55°	n/a	n/a

TABLEAU IV-2 : Angles de contact de différentes gouttelettes protéiques (DsRed, SAB et Fn) de concentrations croissantes (0.01-5 g/L) déposées sur la SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).

Cependant, à partir de 0.25 g/L et jusqu'à 1 ou 5.0 g/L, une plus grande augmentation de l'angle de contact est observée avec la Fn et la DsRed qu'avec la SAB. Si l'on s'intéresse maintenant à la cinétique de déshydratation des gouttelettes protéiques, l'évaporation des différentes gouttelettes protéiques à 23 °C commence à être visible à partir d'1 min (Fig. IV-2 à 4) et est rapide.

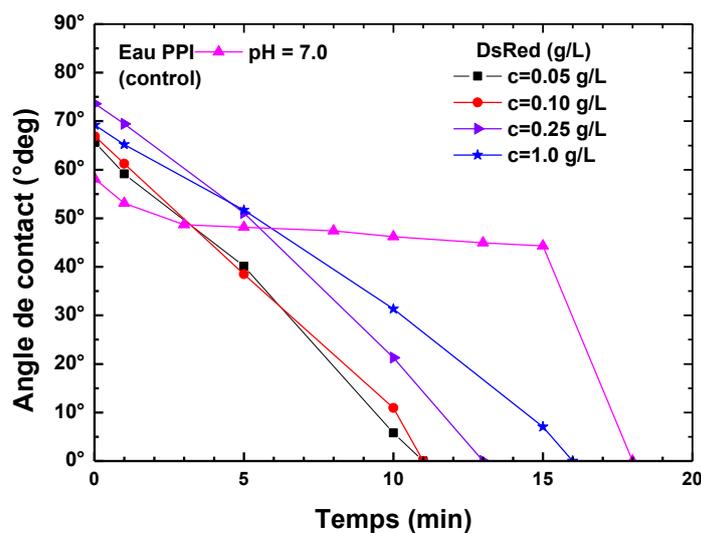


Figure IV-2 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes (3.8 µL) de DsRed (gamme de concentrations 0.01-1 g/L) sur la SiO₂th à 23 °C.

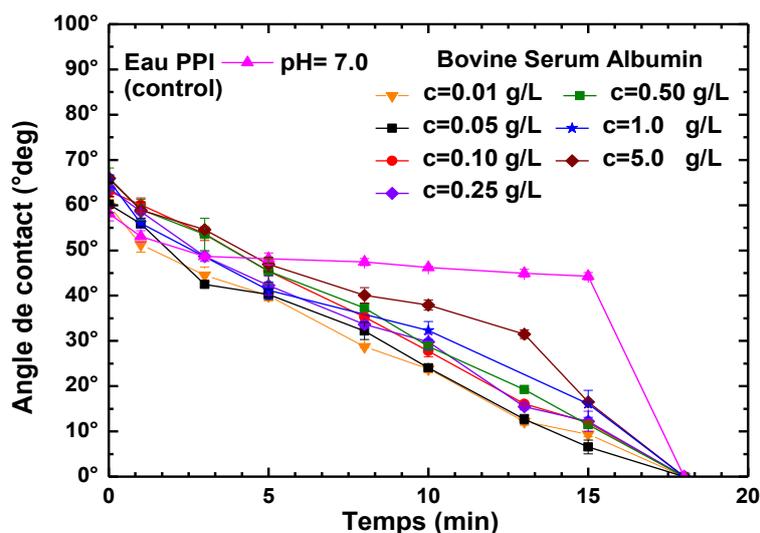


Figure IV-3 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes (3.8 μ l) de SAB (gamme de concentrations 0.01-5 g/L) sur la SiO₂th à 23 °C.

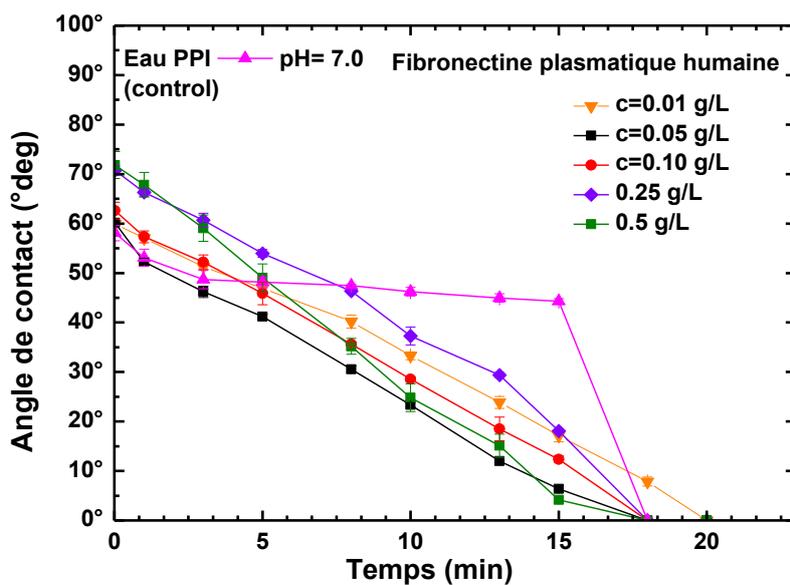


Figure IV-4 : Évolution de la mesure de l'angle de contact en fonction du temps après le dépôt de gouttelettes (3.8 μ l) de Fn (gamme de concentrations 0.01-5 g/L) sur la SiO₂th à 23 °C.

Pour l'ensemble des concentrations testées ($c = 0.01-1$ ou 5 g/L), les gouttelettes protéiques se déshydratent en moins de 18 min. Cependant, avec une gamme de concentrations en DsRed comprises entre 0.05 et 1 g/L, la déshydratation des gouttelettes est complète ($t_{10\text{ min}} = 5^\circ$) entre 10 min et 16 min à 23 °C et est donc plus rapide que la déshydratation des gouttelettes de SAB ou de Fn. La déshydratation des différentes gouttelettes protéiques présente une

diminution linéaire de l'angle de contact, ce qui est différent en comparaison avec celle de l'EPPI dont le phénomène d'hystérésis de l'angle de contact est observé.

1.2 Caractérisation morphologique et structurale des protéines déshydratées

Après la déshydratation complète des différentes gouttelettes protéiques, l'aspect visuel des dépôts protéiques formés a été étudié. Les Tableaux IV-3, 4 et 5 présentent les images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de DsRed, de SAB et de Fn respectivement, déposées sur la SiO₂th.

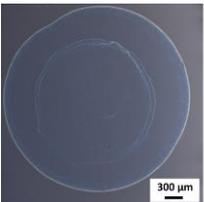
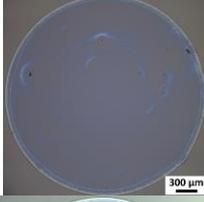
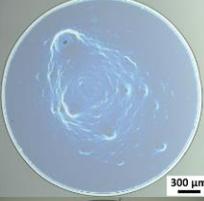
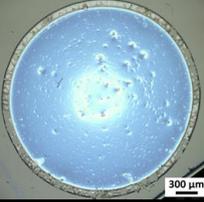
DsRed (g/L)	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A	Images optiques des gouttelettes déshydratées	Diamètre des gouttelettes déshydratées
Control pH=7.0		58.1° ±1.60°	n/a	n/a
0.05		65.40° ±0.90°		$d = 2.8$ mm
0.1		65.50° ±1.7°		$d = 2.8$ mm
0.25		73.70° ±0.97°		$d = 2.7$ mm
1		72.00° ±2.30°		$d = 2.6$ mm

Tableau IV-3 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de DsRed (gamme de concentration de 0.05-1 g/L) déposées sur la SiO₂th. Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).

Avec l'augmentation des concentrations protéiques, les dépôts protéiques formés après déshydratation apparaissent bien visuellement de plus en plus importants. On peut également remarquer qu'avec la SAB ou la DsRed, l'aspect visuel des dépôts protéiques obtenus en

augmentant les concentrations des solutions protéiques utilisées apparait de plus en plus homogène (Tab. IV-3 et 4).

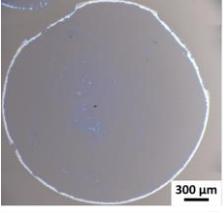
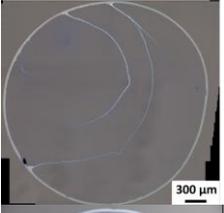
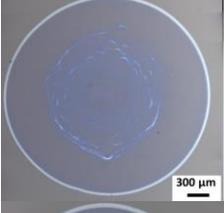
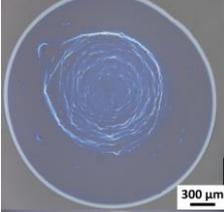
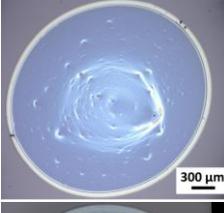
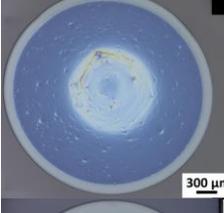
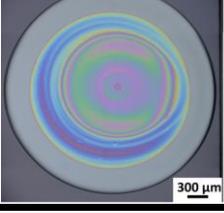
BSA (g/L)	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact $-\theta_A$	Images optiques des gouttelettes déshydratées	Diamètre des gouttelettes déshydratées
Control pH=7.0		$58.1^\circ \pm 1.6^\circ$	n/a	n/a
0.01		$59.8^\circ \pm 1.6^\circ$		$d = 2.9 \text{ mm}$
0.05		$60.2^\circ \pm 1.8^\circ$		$d = 2.9 \text{ mm}$
0.1		$63.0^\circ \pm 1.3^\circ$		$d = 2.9 \text{ mm}$
0.25		$63.7^\circ \pm 0.52^\circ$		$d = 3.0 \text{ mm}$
0.50		$64.0^\circ \pm 0.50^\circ$		$d = 3.0 \text{ mm}$
1		$65.35^\circ \pm 2.6^\circ$		$d = 3.0 \text{ mm}$
5		$63^\circ \pm 0.70^\circ$		$d = 3.0 \text{ mm}$

Tableau IV-4 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de SAB (gamme de concentration de 0.01-5 g/L) déposées sur la SiO_2^{th} . Angles de contact (moyenne \pm ET, n=3).

Dans le cas de la Fn, on observe la formation de structures cristallines plus complexes dont le nombre augmente également avec l'augmentation des concentrations (Tab. IV-5). Ces structures se forment à partir du rebord des gouttelettes déshydratées et convergent vers le centre des dépôts au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en Fn.

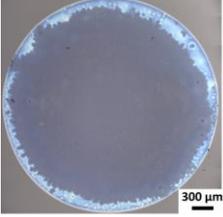
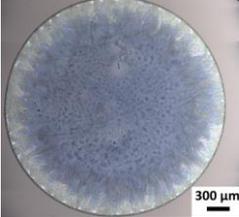
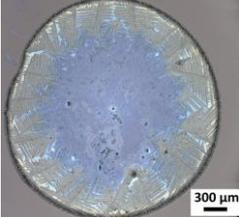
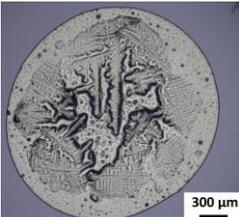
Fn (g/L)	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A	Images optiques des gouttelettes déshydratées	Diamètre des gouttelettes déshydratées
Control pH=7.0		58.1° ±1.60°	n/a	n/a
0.01		59.9° ±1.9°		$d = 3.0 \text{ mm}$
0.05		60.1° ±0.3°		$d = 3.0 \text{ mm}$
0.1		62.6° ±1.7°		$d = 3.0 \text{ mm}$
0.25		70.7° ±0.97°		$d = 3.0 \text{ mm}$
0.50		71.8° ±2.7°		$d = 3.0 \text{ mm}$
1		81.3° ±0.87°		$d = 3.0 \text{ mm}$

Tableau IV-5 : Images optiques des différentes gouttelettes déshydratées de Fn (gamme de concentration de 0.01-1 g/L) déposées sur la SiO_2^{th} . Angles de contact (moyenne \pm ET, $n=3$).

Une épaisseur plus importante au niveau des rebords des différentes gouttelettes déshydratées (Tab. IV-3, 4 et 5) est également notée. En effet, l'aspect visuel des rebords des dépôts protéiques présente une couleur plus foncée représentant une quantité de matière plus importante à ce niveau. Cette observation a également été confirmée par profilométrie. L'augmentation de la largeur (l), mais également de la hauteur (h) du rebord des gouttelettes déshydratées est également corrélée à l'augmentation de la concentration protéique utilisée. Le diamètre des dépôts protéiques déshydratés de SAB ou de Fn est assez similaire (2.9 et 3 mm, respectivement) et ne varie guère avec l'augmentation de la concentration protéique. Les gouttelettes protéiques déposées à la surface de la SiO_2^{th} s'étalent instantanément (le diamètre est imposé par les points de contact épinglés, voir figure IV-1) et atteignent le diamètre maximal du dépôt. Avec la solution contrôle, la gouttelette d'eau déposée s'étale également et atteint également le diamètre maximal. Cependant, ce diamètre diminue au cours de la déshydratation.

Avec les trois protéines utilisées, le processus d'évaporation entraîne la présence d'un dépôt protéique après l'évaporation complète des gouttelettes protéiques qui est structurée sous la forme d'un anneau rempli. Cet effet observé avec l'ensemble des gouttelettes protéiques est appelé l'effet « tache de café ». La forme des dépôts protéiques déshydratés obtenus est due dans notre cas aux protéines présentes dans la gouttelette et qui s'adsorbent sur la surface. Les protéines adsorbées provoquent ainsi la fixation des points de contact entre la gouttelette et la surface du substrat. On remarque également que l'épaisseur des rebords des différents dépôts est plus importante qu'au niveau du centre du dépôt et tend à augmenter avec l'augmentation des concentrations protéiques utilisées. Cette organisation est due au mouvement des protéines dans la gouttelette durant tout le processus d'évaporation. En raison des mouvements convectifs, les protéines ont tendance à s'accumuler au niveau des rebords de la gouttelette durant tout le processus d'évaporation. En théorie, une région avec une tension superficielle élevée exerce une force d'attraction sur les régions voisines ayant une tension superficielle inférieure, ce qui induit un écoulement à travers le gradient de tension superficielle (« effet Marangoni ») (Trantum *et al.*, 2013). Durant l'évaporation d'une gouttelette, la ligne de contact est l'endroit où se produit la tension superficielle la plus faible (Hu and Larson, 2005). Le flux sortant ainsi généré entraîne une accumulation des protéines au niveau de la ligne de contact. De plus, le flux d'évaporation accru qui se met en place au niveau de la ligne de contact liquide-substrat est bloqué. Cette fixation provoque alors l'écoulement capillaire du liquide afin d'équilibrer la perte de liquide due à l'évaporation au niveau des points de contact. Cet écoulement entraîne alors les protéines jusqu'au niveau du bord de la gouttelette, provoquant ainsi l'accumulation des protéines au niveau des rebords des dépôts protéiques après

évaporation. Durant la déshydratation, d'autres processus (impliquant de nombreux mécanismes hydrodynamiques) peuvent également rentrer en jeu. On peut citer par exemple, les forces intermoléculaires entre les protéines et l'air, mais également des mécanismes thermodynamiques irréversibles dus à la topographie de la surface de la SiO_2^{th} avec des réarrangements des groupes chimiques des protéines (Sefiane, 2010). L'évaporation des gouttelettes protéiques conduit alors à l'auto-organisation des protéines sur la surface solide et à la formation de motifs morphologiques bien définis après l'évaporation complète des gouttelettes (Fig. IV-5).

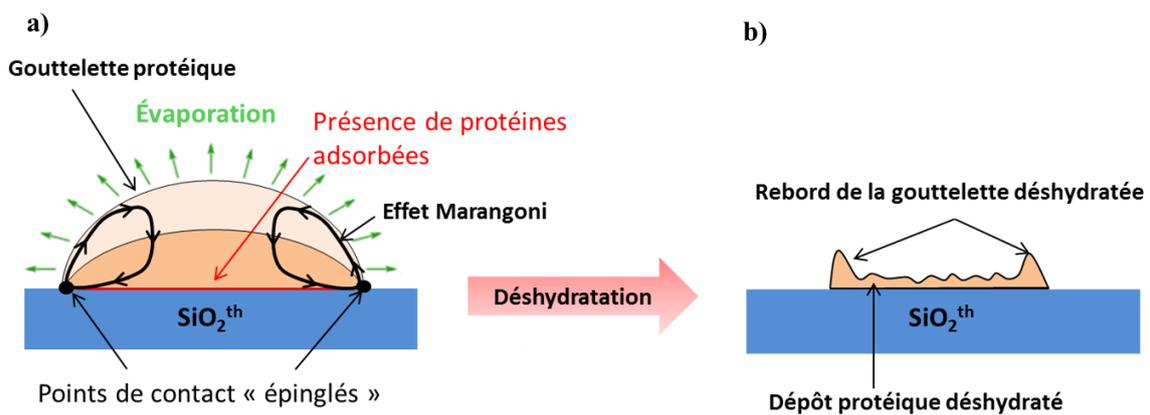


Figure IV-5 : Représentation schématique du processus de déshydratation d'une gouttelette protéique déposée sur la SiO_2^{th} : (a) évolution de la gouttelette lors de la déshydratation et (b) état final après déshydratation complète.

Afin d'obtenir un aperçu des changements morphologiques de l'organisation des protéines déshydratées après leur adsorption à la surface de la SiO_2^{th} , les différents dépôts protéiques ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB). La Figure IV-6 présente des images MEB du rebord et du centre d'une gouttelette de Fn de 0.05 g/L déshydratée à la surface de la SiO_2^{th} . De nombreuses structures cristallines différentes, organisées en ramifications sont observées. On note également des espaces libres. Les éléments en blanc correspondent à des cristaux de NaCl confirmés par des analyses EDS (spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie ou Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) (données non présentées). Les éléments grisés situés juste en dessous représentent la protéine de Fn adsorbée sur la surface (données confirmées par EDS) (Fig. IV-6, image de la ligne du bas : $\times 10000$). Les cristaux de NaCl présents sur les photographies proviennent du tampon de conditionnement utilisé lors de la préparation de la protéine sous forme lyophilisée. En effet, l'EPPI dans laquelle a été diluée la Fn est une eau ultra-pure qui ne contient des sels et des éléments métalliques que sous forme de traces.

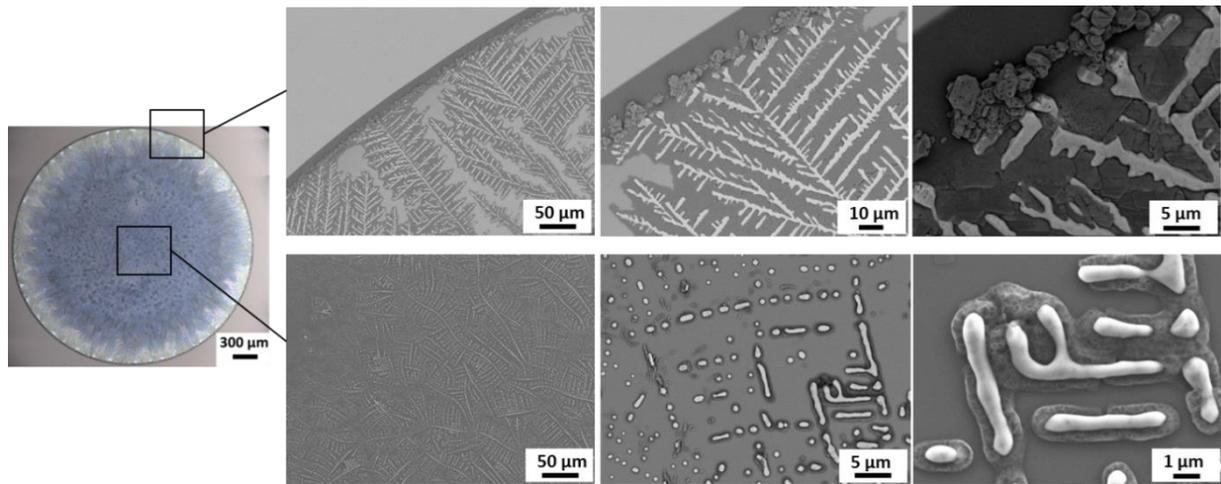


Figure IV-6 : Images MEB du rebord et du centre d'une gouttelette de Fn (0.05 g/L) déshydratée sur la SiO_2^{th} . Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 1000$, $\times 3000$, respectivement. Ligne du bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, $\times 10000$, respectivement.

La figure IV-7 présente les images MEB d'une gouttelette de SAB (0.05 g/L) déshydratées à la surface de la SiO_2^{th} . Une uniformité quasi parfaite du dépôt protéique est notée. En effet, la SAB étant une protéine « molle » elle a tendance à s'étaler à la surface de la SiO_2^{th} .

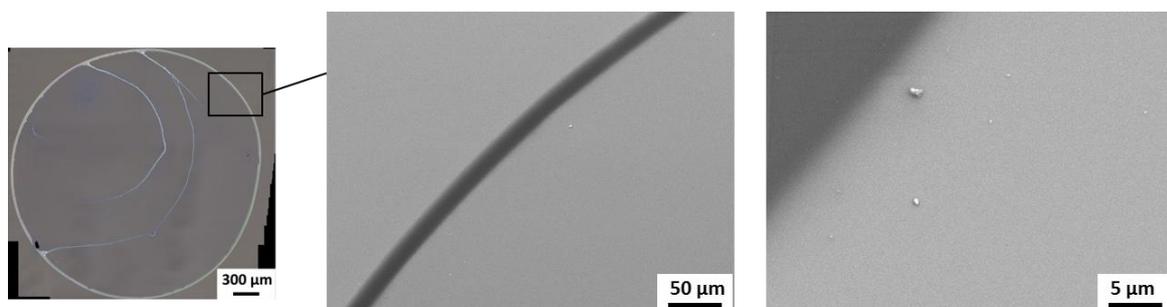


Figure IV-7 : Images MEB du rebord d'une gouttelette de SAB (0.05 g/L) déshydratée sur la SiO_2^{th} . Les images successives correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, respectivement.

La figure IV-8 correspond à une gouttelette de DsRed (0.05 g/L, pH = 7.0) déshydratée sur SiO_2^{th} . En raison de sa nature tétramérique, la DsRed ne se déplie pas fortement pour former une couche mince continue sur la surface de SiO_2^{th} . Sa rigidité structurelle est à l'origine d'une couche protéique avec des pores de formes et de tailles différentes. Les structures en forme de losanges blanchâtres observables sur l'image sont des résidus de NaCl.

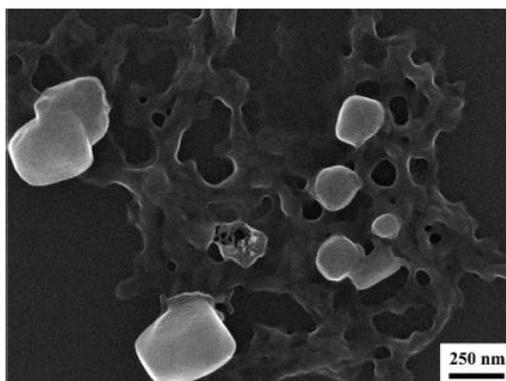


Figure IV-8 : Image MEB de la DsRed ($c= 0.05$ g/L, à $\text{pH}=7$) adsorbée et déshydratée ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$) sur la surface de la SiO_2^{th} .

En fonction de la nature de la protéine adsorbée sur la surface des différences significatives de comportement morphologique du dépôt protéique déshydraté sur la SiO_2^{th} sont observées

1.3 Étude de l'interaction des gouttelettes de DsRed ou de SAB avec la SiO_2^{th} à différents pH (3-11)

Le comportement des gouttelettes protéiques (0.05 g/L) à différents pH a été évalué en mesurant l'angle de contact après dépôt sur la SiO_2^{th} . Les tableaux IV-6 et 7 présentent les résultats des mesures des angles de contact des gouttelettes de SAB et de DsRed pour une gamme de pH allant de 3-11. Les images des différents dépôts protéiques obtenus après déshydratation sont également présentées. On observe qu'avec un pH basique (9 et 11) ou acide (3 et 5) l'angle de contact des gouttelettes de SAB est plus important qu'avec un pH neutre. Le diamètre des dépôts reste inchangé sous l'influence du pH et est égal à 2.7 mm. Avec les pH acides, l'aspect visuel des dépôts obtenus est homogène alors qu'avec les pH basiques on assiste à la formation d'éléments granuleux et de structures cristallines. Dans le cas de la DsRed l'angle de contact ne varie guère à part dans les pH acides ($\text{pH} < 4$) où l'on peut souligner une augmentation ($\text{pH}= 7$, $65.40^{\circ} \pm 0.20^{\circ}$ vs $73.9^{\circ} \pm 2.10^{\circ}$ à $\text{pH}= 3$). Les protéines de DsRed semblent plutôt stables dans les pH basiques de 7 à 11 et cette stabilité est en accord avec les études précédemment rapportées (Baird *et al.*, 2000; Vrzheschch *et al.*, 2000). En observant les dépôts protéiques obtenus, la forme et la structure des gouttelettes protéiques déshydratées varient en fonction des pH des solutions tampons utilisées. Après déshydratation, que ce soit pour la DsRed ou la SAB, on observe un dépôt protéique uniforme sous les conditions acides alors que pour les solutions plus basiques, on obtient la formation de cristaux avec des zones

beaucoup plus hétérogènes. Le diamètre obtenu pour les deux protéines sous les conditions acides et basiques est similaire ($d= 2.7-2.9$ mm).

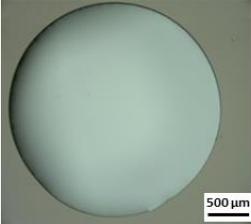
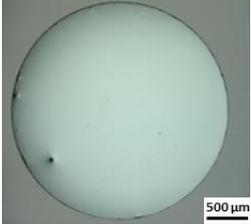
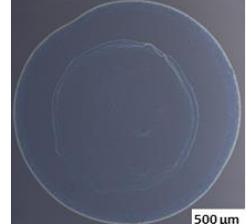
pH	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact - Θ_A	Images optiques des gouttelettes déshydratées	Diamètre des gouttelettes déshydratées
Control pH=7.0		58.1° ±1.60°	n/a	n/a
3.0		73.9° ±2.10°		$d = 2.7$ mm
5.0		67.6° ±1.30°		$d = 2.7$ mm
7.0		65.4° ±0.20°		$d = 2.8$ mm
9.0		69.2° ±0.80°		$d = 2.7$ mm
11.0		67.7° ±0.30°		$d = 2.7$ mm

Tableau IV-6 : Caractéristiques des gouttelettes de DsRed (0.05 g/L) déposées sur la SiO₂th dans une gamme de pH de 3 à 11 avec T = 23 °C. Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).

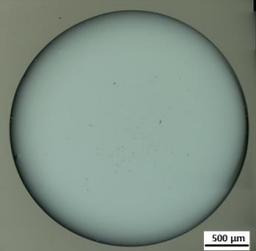
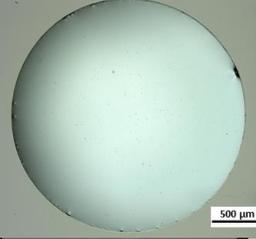
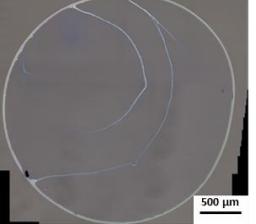
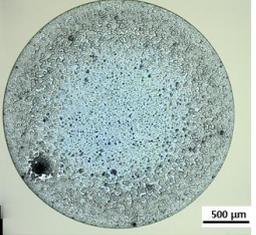
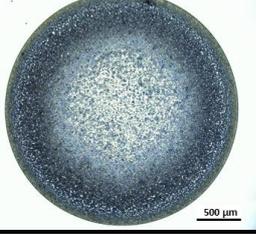
pH	Images des gouttelettes déposées à 1s	Angle de contact $-\Theta_A$	Images optiques des gouttelettes déshydratées	Diamètre des gouttelettes déshydratées
Control pH=7.0		58.1° ±1.6°	n/a	n/a
3		67.7° ±1.2°		$d = 2.9$ mm
5.0		69.80° ±1.6°		$d = 2.9$ mm
7.0		60.2° ±1.8°		$d = 2.9$ mm
9.0		66.40° ±0.30°		$d = 3.0$ mm
11.0		66.9° ±2.3°		$d = 3.0$ mm

Tableau IV-7 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB (0.05 g/L) déposées sur la SiO₂th dans une gamme de pH de 3 à 11 et avec T = 23 °C. Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).

Dans cette première section, des mesures de l'angle de contact ont été effectuées sur la SiO₂th avec des solutions protéiques de différentes concentrations et sous différents pH. Les différents dépôts protéiques résultant de la déshydratation des gouttelettes ont également été analysés en microscopie optique et en microscopie électronique à balayage. Dans la section

suivante, on s'intéressera à une autre configuration des protéines adsorbées sur la SiO₂th en utilisant notamment des couches minces protéiques élaborées par enduction par trempage.

2 Étude de l'interaction de couches minces protéiques déshydratées avec la SiO₂th

2.1 Morphologie des couches minces protéiques déshydratées

Pour obtenir des informations sur l'organisation structurale des couches minces protéiques formées, celles-ci ont été premièrement analysées par microscopie optique à l'aide d'un grossissement x 500.

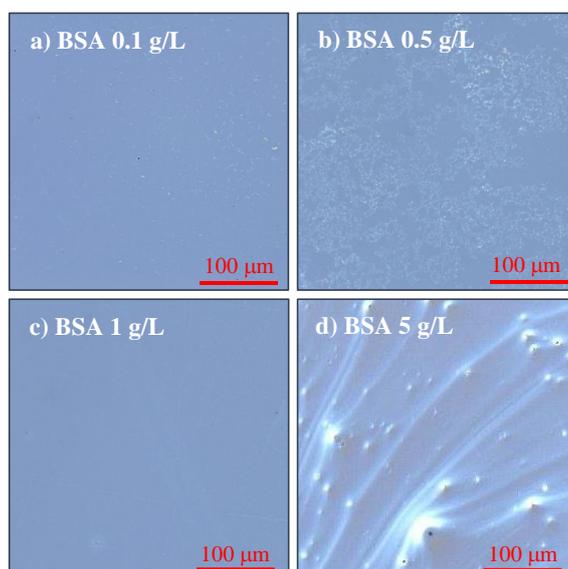


Figure IV-9 : Micrographies optiques (images pseudocouleur) de couches minces de SAB élaborées avec différentes concentrations de solutions : (a) 0.1 g/L (b) 0.5 g/L (c) 1.0 g/L et (d) 5.0 g/L après adsorption et déshydratation à température ambiante et à pression atmosphérique sur des substrats de SiO₂th de 100 nm d'épaisseur. Toutes les micrographies ont été acquises avec un grossissement × 500.

Bien qu'il soit difficile de mettre en évidence une altération de la structure des protéines en raison de la résolution spatiale limitée de la technique et de la taille nanométrique des protéines, des modèles caractéristiques de la formation des couches protéiques à l'échelle micrométrique peuvent être déduits. Les micrographies optiques correspondant aux différentes concentrations en SAB (0.1 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L et 5.0 g/L) sont présentées sur les figures IV-9 (a) à (d). En ce qui concerne la morphologie des couches minces de SAB, à partir d'une concentration de 0.1 g/L, on peut observer la présence d'éléments à contraste blanc (Fig. IV-9

(a) et (b)), qui disparaissent complètement à une concentration de 1.0 g/L (Fig. IV-9 (c)). Ces observations sont très probablement dues à la discontinuité de la couche protéique ou à de petits amas de protéines. Une augmentation supplémentaire de la concentration en protéines (5 g/L) induit la formation d'une couche non uniforme, caractérisée par des pics et des creux, due à une organisation plus complexe des protéines à la surface de la SiO₂th (Fig. IV-9 (d)).

Une comparaison entre les couches minces de SAB et de DsRed élaborées avec une solution protéique de 0.05 g/L est présentée sur la figure IV-10 (a) et (d). Pour obtenir des informations à l'échelle nanométrique sur l'étape d'organisation des deux couches protéiques, une étude AFM a été effectuée en mode PF-QNM (PeakForce-Quantitative Nanomechanical) (Figures IV-10 (b) et (e)). La partie AFM de l'étude a été réalisée en collaboration étroite avec Christina Villeneuve-Faure (MDC UPS) du LAPLACE. À cette faible concentration, la DsRed induit une couverture protéique partielle de la surface. L'analyse statistique effectuée sur plus de 300 amas révèle que la distance moyenne entre les protéines est de 18.5 µm avec une dispersion de 11.2 µm pour la couche mince de DsRed. Pour la SAB les résultats obtenus avec l'AFM montrent que les protéines sont concentrées au niveau des taches blanchâtres. La comparaison des couches protéiques de SAB et de DsRed obtenues montre un comportement différent dans le processus d'adsorption des protéines sur la SiO₂th. En effet, les protéines de SAB s'organisent en un réseau de type « dentelle » alors que les protéines de DsRed présentent une structure de type « tige ». Les différentes organisations structurales détectées sont présentées dans les figures IV-10 (c) et (f). Avec la SAB, l'histogramme de hauteur (inséré dans la figure IV-10 (c)) montre une valeur de 4.3 nm entre la surface du substrat et le sommet de la couche protéique formée. Cette valeur est cohérente avec la taille de la SAB et sa plus petite dimension (axe mineur du sphéroïde) (*All About Albumin*, 1995; Silva-Bermudez *et al.*, 2011) suggérant que les protéines sont adsorbées latéralement avec leurs plus grands axes parallèles à la surface de la SiO₂th (« side-on »). Ces résultats suggèrent également qu'à cette concentration (0.05 g/L), la couche de SAB résultante est principalement constituée d'une monocouche protéique.

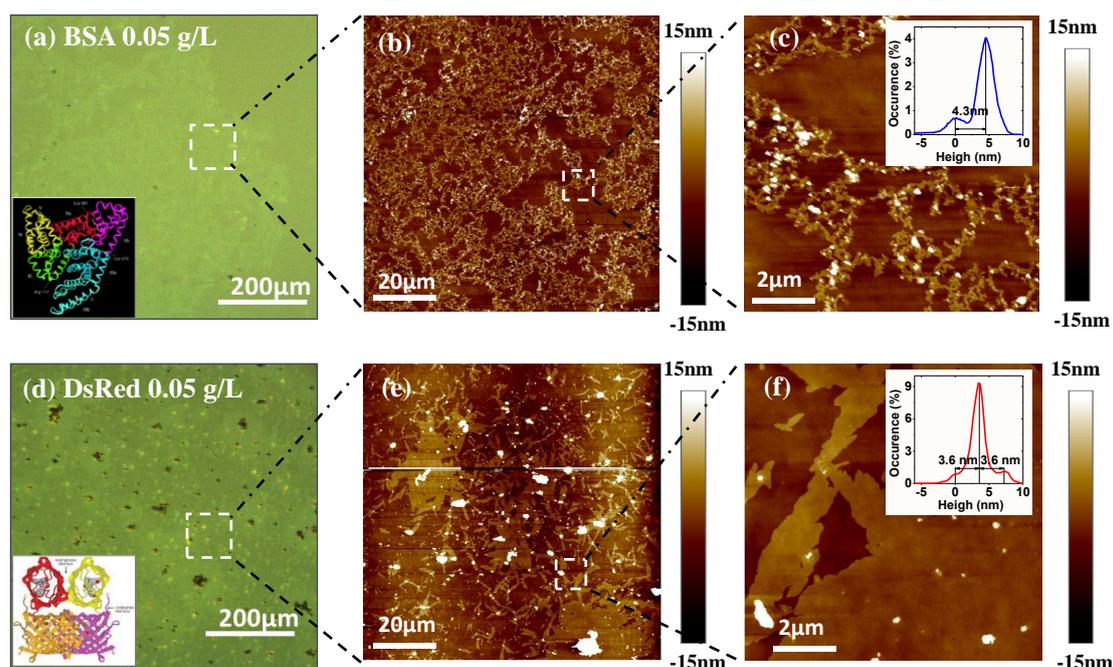


Figure IV-10 : Ligne du haut : Couche mince de SAB élaborée avec une solution protéique de concentration 0.05 g/L, après adsorption et déshydratation des protéines à température ambiante et à pression atmosphérique, sur des substrats de SiO₂th de 100 nm d'épaisseur. (a) Micrographie optique en pseudocouleur, en insérant une image de la SAB, (b) Mesures AFM effectuées sur une région de 100 μm ×100 μm, (c) Mesures AFM effectuées sur une région de 10 μm ×10 μm (en insert l'histogramme de hauteur). Ligne du bas : Couche mince de DsRed (0.05 g /L) (d) images optiques en pseudocouleur, avec une image insérée représentant la DsRed (e) Mesures AFM sur une région de 100 μm ×100 μm, (f) Mesures AFM sur une région de 10 μm ×10 μm (en insert l'histogramme de hauteur).

En ce qui concerne la DsRed, l'histogramme de hauteur présenté dans l'insert sur la figure IV-10 (f) montre une valeur de 3.6 nm entre le substrat et la couche protéique. La valeur obtenue est cohérente avec la dimension de la protéine sous sa forme monomérique (Yarbrough *et al.*, 2001). De plus, un second pic beaucoup moins intense est observé avec une hauteur double, de 7.2 nm, ce qui correspond à une couche formée par les protéines sous leur forme tétramérique. En conséquence, ces résultats suggèrent que la couche de DsRed élaborée avec une solution de concentration égale à 0.05 g/L est constituée principalement d'une monocouche de monomères avec une petite quantité de résidus tétramériques.

Des couches protéiques de Fn ont aussi été élaborées par enduction par trempage d'un substrat de SiO₂th dans une solution de Fn de concentration 0.05 g/L. La couche protéique résultante a été analysée ensuite par AFM. Les images présentées dans la figure IV-11 correspondent à la topographie et à la cartographie de propriétés de la couche protéiques de Fn. La première observation suggère que la Fn s'étale sur la surface de SiO₂th. On peut également

observer en haut à droite la présence d'une importante quantité d'amas de Fn qui possèdent des structures fibreuses avec des ramifications. Comparée à la SAB ou à la DsRed, l'organisation de la couche mince de Fn adsorbée et déshydratée est différente, caractérisée par des ramifications, de même que pour les gouttelettes de Fn (Figure IV-6). Des analyses complémentaires seront nécessaires afin de valider ces différentes suggestions.

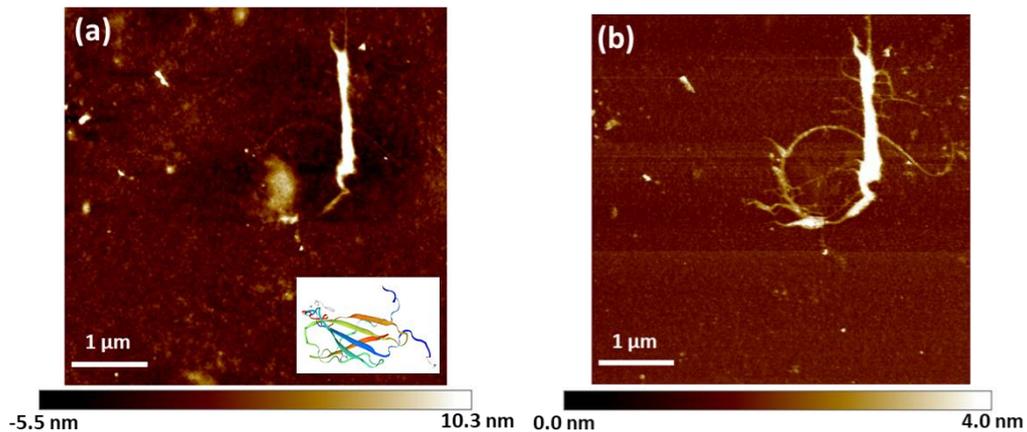


Figure IV-11 : Mesures AFM effectuées en mode PF-QNM de la couche mince de Fn (solution à 0.05 g/L) adsorbée et déshydratée sur une couche de SiO₂th. Les images (a) topographiques et (b) cartographie de propriétés, correspondent aux mesures réalisées sur une région de 5 µm × 5 µm de la couche mince protéique. L'insert de l'image (a) correspond à la représentation schématisée de la structure d'un brin de Fn.

2.2 Etude des propriétés optiques des couches minces protéiques par ellipsométrie spectroscopique

Pour suivre le processus d'adhésion des protéines et mesurer l'épaisseur des couches protéiques obtenues, nous avons utilisé une technique optique non destructive et non invasive, l'ellipsométrie spectroscopique. Comme la SAB est une protéine non absorbante optiquement dans la gamme des longueur d'onde du visible, les spectres ont été simulés en utilisant la loi de Cauchy (Scarangella *et al.*, 2018; annexe D). La DsRed étant une protéine optiquement absorbante dans le domaine du visible, c'est donc le modèle de Lorentz qui a été privilégié avec cette protéine. Plus d'informations concernant les différents spectres simulés avec les couches de SAB et de DsRed peuvent être retrouvées dans notre article (Scarangella *et al.*, 2018; annexe

D). Avant le dépôt des couches protéiques, l'épaisseur de la couche mince de SiO₂th utilisée comme substrat a été mesurée avec précision afin d'améliorer également la précision de la mesure de l'épaisseur de la couche protéique. La légère différence observée entre les spectres ellipsométriques avant et après la formation des couches protéiques contient en effet l'information sur l'épaisseur et la quantité de protéines adsorbées à la surface de la SiO₂th pour les différentes concentrations protéiques utilisées. L'ellipsométrie spectroscopique a également été appliquée afin de calculer la masse protéique adsorbée à la surface de la SiO₂th par unité de surface Γ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en utilisant la formule de Feijter (Feijter *et al.*, 1978). Les épaisseurs des couches de SAB ou de DsRed, les indices de réfraction et les masses protéiques, obtenus en fonction des concentrations des solutions protéiques utilisées, sont indiqués dans le tableau IV-8.

En augmentant la concentration en SAB de 0.01 g/L à 0.05 g/L, les mesures ellipsométriques réalisées montrent que l'épaisseur de la couche protéique formée augmente d'abord légèrement. L'épaisseur de la couche reste pratiquement identique jusqu'à la concentration 0.1 g/L. Après 0.1 g/L, l'augmentation de l'épaisseur est plus évidente et devient plus importante au-dessus de 2.5 g/L. On observe également que l'indice de réfraction (n_p) des protéines augmente légèrement en augmentant la concentration de la solution

Conc. (g/L)	Indice de réfraction (n) à 632 nm	Épaisseur (nm)	R ²	RMSE	Γ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
BSA					
0.01	1.35	3.1±0.2	0.99945	0.00792	0.047
0.05	1.42	3.9±0.1	0.99942	0.00822	0.199
0.1	1.42	3.8±0.3	0.99937	0.00850	0.203
0.5	1.42	4.5±0.3	0.9994	0.00847	0.243
1.0	1.46	5.3±0.2	0.99952	0.00732	0.455
2.5	1.54	9.3±0.3	0.99717	0.01848	1.004
5.0	1.56	26.8±0.7	0.97727	0.05202	3.434
DsRed					
0.01	1.44	3.9±0.1	0.99967	0.00739	0.259
0.05	1.44	4.2±0.1	0.99949	0.00753	0.257
0.1	1.40	3.7±0.2	0.99958	0.00714	0.160

Tableau IV-8 : Mesures ellipsométriques des couches minces déshydratées de SAB et de DsRed élaborées avec des solutions de concentrations 0.0.1 à 5 g/L déposées sur la SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).

Ainsi, en considérant l'indice de réfraction (n_p) obtenu pour les couches protéiques comme une indication de la densité de la couche de SAB formée, on peut affirmer que les

couches les plus denses sont formées au-dessus de 2.5 g/L, alors que pour la plus faible concentration ($c= 0.01$ g/L) la couche formée est probablement discontinue et l'indice de réfraction obtenu est effectif en considérant les parties protéiques et les zones libres entre elles. Ce dernier résultat, associé à l'absence de changements évidents dans l'épaisseur de la couche protéique de SAB pour les concentrations de 0.01 g/L à 0.1 g/L, suggère que pour les faibles concentrations, la couche protéique commence à se former par remplissage des espaces vides et devient de plus en plus dense sur le plan horizontal. Ces observations sont également cohérentes avec les mesures topographiques effectuées par AFM et évoquées précédemment.

Avec une concentration de 0.01 g/L en DsRed, une valeur de 3.9 ± 0.1 nm a été retrouvée pour l'épaisseur de la couche protéique formée. L'épaisseur retrouvée, légèrement supérieure de la taille d'un monomère de DsRed (3.7 nm), suggère qu'en contact avec la surface de SiO_2^{th} la DsRed, qui est tétramérique en solution, adsorbe sur la surface sous forme de monomères ou de dimères. Quelques résidus tétramériques restent. Ce résultat est en cohérence avec les mesures AFM pour la même concentration des protéines en solution. Aucune variation significative des paramètres de la couche mince protéique résultante de DsRed (épaisseur, indice de réfraction ou concentration superficielle) n'a été obtenue avec une augmentation de la concentration protéique entre 0.01 et 0.1 g/L (Tab. IV-8).

2.3 Caractéristiques optiques et spectrales des couches minces déshydratées de DsRed, de SAB, et de Fn adsorbées sur la SiO_2^{th}

L'étude des propriétés optiques des couches minces protéiques déshydratées après interaction avec la lumière peut fournir des informations supplémentaires sur les mécanismes d'adhésion des protéines sur les surfaces. Tout d'abord, nous avons étudié l'absorbance optique des solutions protéiques utilisées pour créer les couches minces protéiques à la surface de la SiO_2^{th} . Les spectres présentés à la figure IV-12 montrent les principaux pics d'absorption de la DsRed et de la protéine modèle SAB.

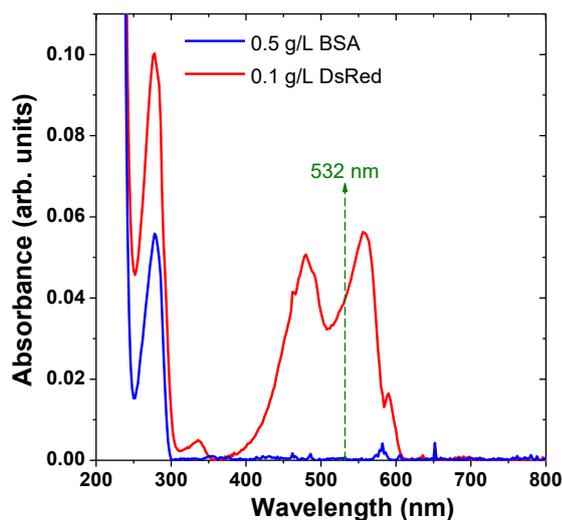


Figure IV-12 : Spectre d'absorption de la solution de SAB (0.5 g/L) et de DsRed (0.05 g/L). Le pic d'absorption à 280 nm, en commun avec les deux solutions, a été attribué aux transitions $\pi - \pi^*$ dans les résidus d'acides aminés aromatiques. Alors que la SAB est transparente dans le visible, la DsRed présente deux pics d'absorption convolués liés aux chromophores constituant la protéine.

Dans le spectre d'absorption de la SAB, seules quelques faibles structures optiques autour des 280 nm provenant des résidus aromatiques des acides aminés (dues aux transitions $\pi - \pi^*$) sont détectées. On peut également observer en dessous de 250 nm la détection de structures due à l'absorption générale de la séquence peptidique (*All About Albumin*, 1995), alors que dans le domaine du visible la réponse optique de la SAB est nulle.

Le spectre d'absorption de la DsRed présente une large bande étendue entre 445 nm et 575 nm (convoluée en deux pics) et un autre pic superposé dans la gamme des UV à 280 nm (Fig. IV-12). Ces pics peuvent être expliqués par la maturation de la fluorescence DsRed en rouge qui prend plusieurs jours en passant par une fluorescence obligatoire et intermédiaire en vert (Marchant *et al.*, 2001). En effet, pendant la maturation du chromophore, le tétramère de DsRed se compose d'oligomères avec le passage d'une forme immature verte émettrice à une forme mature rouge émettrice. Par conséquent, la large bande d'absorption de la DsRed dans la gamme du visible peut être interprétée comme une convolution des bandes d'absorption des chromophores verts immatures et rouges matures, culminant respectivement à 480 nm et à 558 nm avec une largeur à mi-hauteur globale d'environ 135 nm. Pendant le processus d'adhésion et de déshydratation, les propriétés optiques des couches minces de DsRed changent légèrement par rapport aux propriétés des protéines en solution. Les deux pics d'absorption se rapprochent et s'agrandissent, ce qui donne une bande d'absorption convoluée. Cette hypothèse est également étayée par le décalage d'environ 10 nm du pic d'émission de la photoluminescence (PL) (600 nm) par rapport aux valeurs de PL de la DsRed en solution

(583 nm) trouvées dans la littérature (Matz *et al.*, 1999). Pour obtenir des informations supplémentaires sur les protéines adsorbées, nous avons effectué également des mesures FTIR de gouttelettes ou de couches minces déshydratées à la surface de la SiO₂th.

Les spectres FTIR de couches minces déshydratées de SAB (solution à $c = 5$ g/L), de DsRed ou de Fn (solutions à $c = 1.0$ g/L), à la surface d'une couche mince de SiO₂th ont été acquis en mode transmission. L'ensemble des spectres FTIR acquis est présenté dans la figure IV-13. La comparaison directe de l'intensité des pics détectés pour différentes protéines n'est cependant pas possible. On s'intéressera plus particulièrement aux positionnements des pics mesurés en fonction de l'énergie (nombres d'ondes) pour l'ensemble des protéines.

Pour l'ensemble des échantillons testés, nous avons utilisé des gouttelettes protéiques adsorbées et déshydratées à la surface d'une couche mince de SiO₂th présent sur un substrat intrinsèque de silicium (Si). Pour des concentrations inférieures à 1.0 g/L, à part le signal de la SiO₂th, aucun signal protéique n'a pu être détecté en raison de la faible épaisseur de la couche protéique. Pour des épaisseurs des couches protéiques suffisamment importantes (> 100 nm) les spectres FTIR acquis contiennent les vibrations caractéristiques des liaisons de la couche de SiO₂th et de la structure secondaire des protéines adsorbées et déshydratées sur celle-ci. On retrouve ainsi dans tous les spectres FTIR, les trois modes typiques du dioxyde de silicium amorphe (SiO₂), le Si-O-Si à des vibrations oscillantes à 457 cm⁻¹, le mode d'étirement symétrique à 810 cm⁻¹ et le mode d'étirement asymétrique à 1067 cm⁻¹ (Kirk, 1988). On peut aussi remarquer l'épaulement centré autour de 1250 cm⁻¹ caractéristiques de la SiO₂th.

Le spectre FTIR de la DsRed confirme bien la présence de cette protéine dans son état natif sur la couche mince de SiO₂th (Fig. IV-13, en rouge). On observe la présence de la bande amide I avec des pics centrés à 1654 cm⁻¹ qui correspondent aux hélices α et un autre pic à 1684 cm⁻¹ qui correspond aux feuillets β des protéines adsorbées. La bande amide II centrée à 1530 cm⁻¹, et probablement la bande amide III vers 1340 cm⁻¹, sont également détectables. Les autres bandes sur le spectre sont l'amide A (NH) (3300-3500 cm⁻¹) et les liaisons C-H dans un environnement CH₃ (symétrique à 2900 cm⁻¹ et asymétriques à 2960 cm⁻¹).

Les spectres FTIR de couches protéiques de SAB déshydratées présenté dans la figure IV-13 (en bleu) a été obtenu pour une concentration de 5.0 g/L en solution. A partir du spectre FTIR acquis sur les couches déshydratées de SAB, on observe la présence de la bande Amide I avec des pics centrés à 1654 cm⁻¹ et de la bande Amide II centrée à 1530 cm⁻¹ (Barth, 2007; Soumbo *et al.*, 2016). Ces observations suggèrent que la structure secondaire des

protéines adsorbées et déshydratées sur la couche mince de SiO₂th est conservée. Les autres larges bandes retrouvées entre 3300 et 3500 cm⁻¹ ou entre 2800 et 3100 cm⁻¹ peuvent être reliées aux liaisons Amide A (N-H) et C-H, respectivement.

Le spectre FTIR entre 500 et 4000 cm⁻¹ d'une couche de Fn déshydratée (c = 1 g/L) a également été mesuré et est représenté en vert dans la figure IV-13. On note la présence des bandes amide I vers 1601 cm⁻¹, de la bande amide II vers 1516 cm⁻¹ et de la bande amide A entre 3300 et 3500 cm⁻¹. On peut souligner que dans la littérature que la Fn a été généralement étudiée en solution (Pauthe *et al.*, 2002; Baujard-Lamotte *et al.*, 2008). Les bandes retrouvées dans la littérature pour l'amide I sont généralement comprises entre 1610 et 1700 cm⁻¹ et elles correspondent aux modes d'étirement des groupes carbonyles $\nu(\text{CO})$. Ce décalage entre nos résultats et les données de la littérature peut être dû au fait qu'on utilise pour les mesures FTIR des protéines adsorbées et déshydratées sur la SiO₂th. Cette configuration des couches peut être à l'origine de modifications structurales des protéines entraînant le décalage observé au niveau de la bande amide I. La bande amide II retrouvée dans notre cas vers 1516 cm⁻¹ est également décalée (1530-1550) et correspond aux modes de vibration de flexion du N-H des acides aminés et aux bandes d'étirement antisymétriques du COO⁻ dues aux groupes carboxyliques des acides aminés Asp et Glu (1565-1585 cm⁻¹). La présence des vibrations des liaisons C-H dans un environnement CH₃ vers 3000 cm⁻¹, des liaisons N-H entre 640 et 800 cm⁻¹ et du C=O entre 537 et 606 cm⁻¹ est également observée.

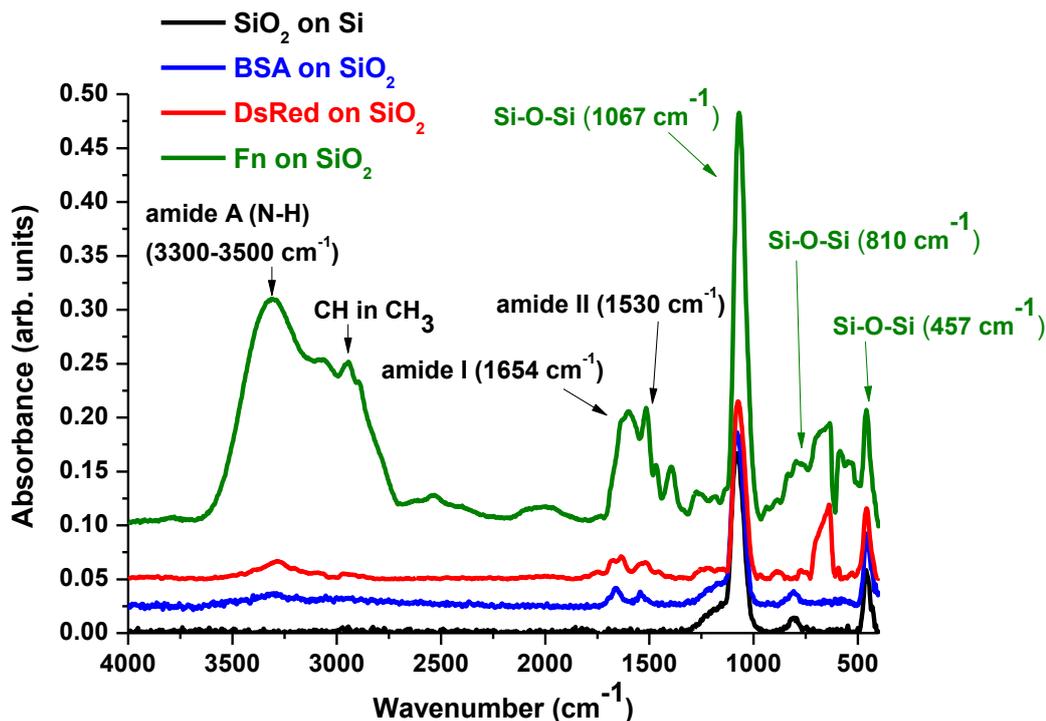


Figure IV-13 : Spectre FTIR d'une couche mince de DsRed (rouge) (solution de 1.0 g/L), de SAB (bleue) (solution de 5.0 g/L) et de Fn (vert) (solution de 1.0 g/L), déshydratée sur une surface de SiO₂.

Les structures protéiques sont considérées relativement instables lorsqu'elles sont exposées à des surfaces solides, car leurs régions internes peuvent également interagir avec la surface solide. La dénaturation des protéines est souvent associée à une perte complète de la structure protéique secondaire. L'ensemble des spectres mesurés avec la DsRed, la SAB ou la Fn confirme la conservation de la structure secondaire des différentes protéines adsorbées et déshydratées sur la SiO₂th.

2.4 Mesures de l'angle de contact de gouttelettes d'EPPI déposées sur une couche mince protéique déshydratée de SAB ou de DsRed

Il est bien connu que les couches protéiques représentent l'étape de conditionnement influençant l'adhésion des microorganismes, la formation du biofilm et la colonisation des surfaces (Horbett and Brash, 1987; Carpentier and Cerf, 1993; Barnes *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002; Silva-Bermudez and Rodil, 2013). Afin d'identifier et de décrire les mécanismes sous-jacents aux couches protéiques adsorbées, nous avons entrepris une étude sur les propriétés de mouillabilité de ces couches protéiques. Nous avons donc comparé les mesures des angles de

contact des gouttelettes d'EPPI (solution contrôle) déposées sur le substrat de silice ou des couches protéiques (Figure IV-14). L'idée est d'étudier la réponse des couches protéiques adsorbées et déshydratées à une réhydratation « simple », mais également à des liquides qui peuvent être utilisés avec des biocapteurs ou des dispositifs bioélectroniques, par exemple.

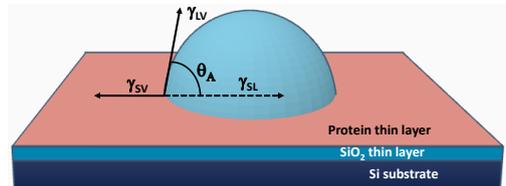


Figure IV-14 : Représentation schématique des tests de mouillabilité effectués sur une couche mince protéique avec γ_{SL} l'interface solide-liquide, γ_{SV} l'interface solide-vapeur et γ_{LV} l'interface liquide-vapeur, θ_A correspond à l'angle de contact.

La figure IV-15 (a) montre l'évolution des angles de contact de gouttelettes d'EPPI mesurés sur les couches minces de SAB (0.05 g/L) et de DsRed (0.05 g/L) adsorbées et déshydratées sur la surface de la SiO_2^{th} . Dans cette figure est également présenté en comparaison l'angle de contact d'une gouttelette d'EPPI déposée à la surface de la SiO_2^{th} vierge. Bien que la nature de la surface de SiO_2^{th} soit hydrophile ($\theta_A = 63.2^\circ$), en présence des couches protéiques adsorbées et déshydratées, la surface résultante devient plus hydrophobe. En effet, la valeur des angles de contact mesurés à t_{1s} augmente à 75.1° avec la couche de DsRed et à 79.9° avec la SAB. Ceci indique une mouillabilité inférieure liée aux couches protéiques présentes à la surface de la SiO_2^{th} . L'angle de contact de la gouttelette d'EPPI mesuré sur les couches de SAB ou de DsRed diminue linéairement dans le temps. Du fait de la présence de la couche protéique, le phénomène d'hystérèse de l'angle de contact rencontrée avec l'EPPI sur la SiO_2^{th} disparaît. La gouttelette d'EPPI est épinglée sur la surface et son diamètre ne varie pas au cours de la déshydratation ce qui entraîne une diminution linéaire de l'angle de contact. La déshydratation des gouttelettes d'EPPI est prononcée lorsque la gouttelette est mise en contact avec la couche protéique. Le temps de déshydratation des gouttelettes d'EPPI est deux fois plus rapide en présence de la couche protéique qu'avec la surface de SiO_2^{th} seule.

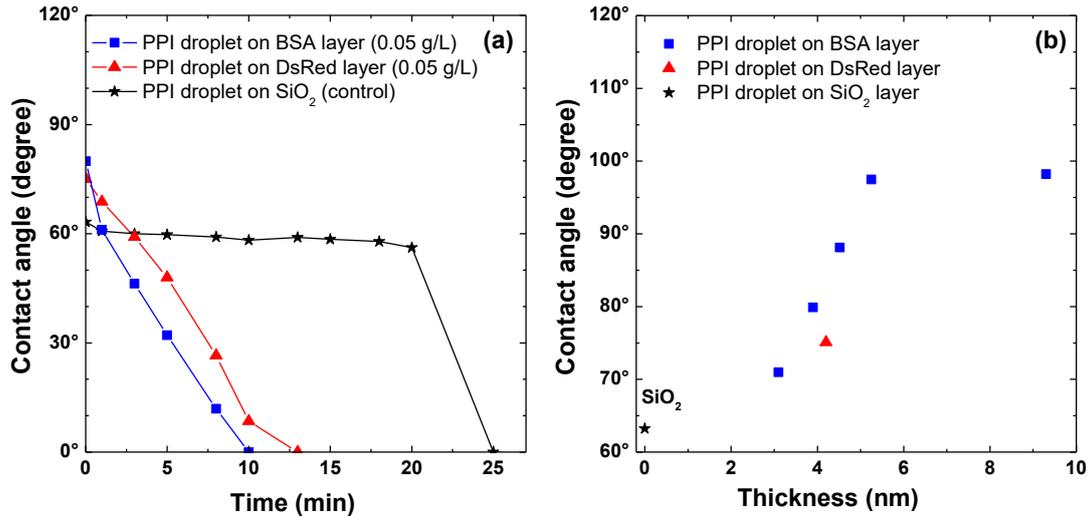


Figure IV-15 : (a) Mesures des angles de contact en fonction du temps de gouttelettes d'EPPI déposées à la surface de couches minces de SAB ou de DsRed déshydratées (0.05 g/L). (b) Comparaison entre les valeurs d'angle de contact d'EPPI et l'épaisseur de la couche mince protéique déshydratée de SAB ou de DsRed formée à la surface de la SiO₂th.

Afin de mieux définir l'existence d'une corrélation possible entre l'épaisseur des couches protéiques formées et leur mouillabilité, nous avons donc systématiquement comparé les angles de contact obtenus aux épaisseurs des couches protéiques mesurées et présentées dans la figure IV-15 (b) et dans le tableau IV-9. On observe que l'augmentation de l'épaisseur des couches protéiques sur la SiO₂th entraîne également l'augmentation des angles de contact des gouttelettes d'EPPI déposées sur celles-ci. Pour les concentrations de SAB comprises entre 0.01 g/L et 0.1 g/L, l'angle de contact dépend presque linéairement de l'épaisseur de la couche protéique formée et varie entre 70° et 80°. Avec une concentration égale à 0.5 g/L ou 1.0 g/L, les angles de contact atteignent 88.13° et 97.47° respectivement. Si l'on compare la valeur de l'angle de contact de la couche de DsRed et celle de la SAB pour une concentration de 0.05 g/L, le caractère plus hydrophile de la couche de DsRed (75.1° vs 79.71°, respectivement) apparaît.

a)

Protéines	BSA					
Concentrations (g/L)	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2.5
Epaisseur de la couche protéique (nm)	2.94	3.5	3.75	4.52	5.25	8.54
Angle de contact (°)	70.98	79.91	79.71	88.13	97.47	98.2
Image des gouttelettes à 1s						

b)

Protéines	SiO ₂ th surface	SAB	DsRed
Concentrations (g/L)		0.05	0.05
Epaisseur (nm)	-	3.5	4.2
Angle de contact (°)	63.21	79.15	75.1
Image des gouttelettes à 1s			

Tableau IV-9 : Récapitulatif des mesures d'angle de contact de gouttelettes d'EPPI déposées sur les différentes couches protéiques (a) de SAB et (b) de SAB ou de DsRed (0.05g/L). L'épaisseur des différentes couches protéiques sur lesquelles a été déposée la gouttelette d'EPPI est également rapportée.

La différence de l'angle de contact mesuré entre la DsRed et la SAB est sûrement due au caractère plus hydrophile de la DsRed comparé à la SAB, avec une orientation particulière des protéines adsorbées à la surface de la SiO₂th. Cette différence observée est en cohérence avec le score de GRAVY (Grand average of hydropathicity) calculé avec la DsRed et la SAB. En effet, si l'on regarde le score GRAVY obtenu à partir de la séquence peptidique des protéines on s'aperçoit que ce score est moins élevé avec la DsRed qu'avec la SAB (-0.599 vs -0.429, respectivement) (Fig. IV-16). La valeur de GRAVY pour une protéine ou un peptide est calculée en ajoutant les valeurs d'hydropathie de chaque résidu d'acide aminé et en divisant par le nombre de résidus dans la séquence ou la longueur de la séquence (Kyte and Doolittle, 1982). L'augmentation du score indique donc une plus grande hydrophobicité de la protéine.

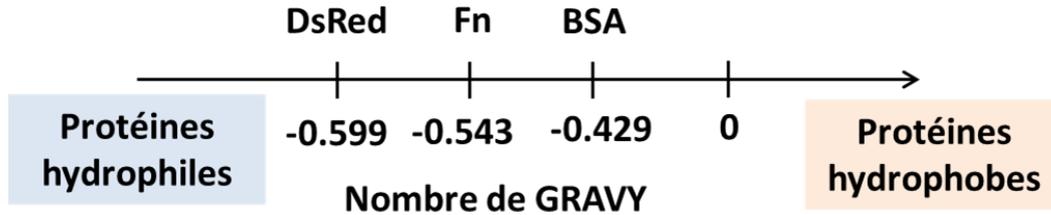


Figure IV-16 : Représentation schématique des scores de GRAVY pour les trois protéines utilisées et indication de la nature des protéines. Les scores ont été calculés à l'aide des séquences peptidiques des protéines avec le programme « java the sequence manipulation suite ». https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html. Les scores représentés sur l'axe ne sont pas à l'échelle.

Si l'on s'intéresse maintenant à la concentration protéique de 1.0 g/L de SAB, on observe qu'elle peut être considérée comme un point de saturation. En effet, avec la dernière concentration utilisée ($c = 2.5$ g/L), l'angle de contact ne varie que légèrement ($\theta_A = 98.19^\circ$), atteignant ainsi un plateau (Fig. IV-15, b et Tab. IV-9). Cela signifie qu'une augmentation supplémentaire de la concentration protéique et donc de l'épaisseur de la couche protéique n'entraînera qu'une augmentation de l'épaisseur de la couche protéique sans modifier l'hydrophobicité de cette couche. Si l'on considère que le temps d'immersion des substrats de SiO_2^{th} dans les solutions protéiques a été constant (1 h) pour toutes les concentrations de SAB utilisées, on peut conclure que jusqu'à 1.0 g/L l'angle de contact est fortement influencé par les concentrations des solutions qui déterminent non seulement l'épaisseur de la couche, mais également sa conformation (remplissage de la surface) sur la surface de la SiO_2^{th} . Pour des concentrations plus élevées, même si l'épaisseur de la couche protéique continue d'augmenter, aucune influence sur l'angle de contact n'est détectée ce qui signifie qu'aucun autre changement conformationnel et morphologique de la couche adsorbée sur la surface de la SiO_2^{th} impactant l'hydrophobicité n'a lieu. Cette étude préliminaire ouvre de nombreuses perspectives sur des applications dans le domaine biomédical et sera ensuite orientée vers l'étude de l'adhésion des microorganismes en présence de ces couches minces protéiques qui fera l'objet du chapitre V.

Dans cette deuxième section, l'analyse des différents dépôts obtenus a notamment été étudiée par spectroscopie FTIR et AFM, afin d'obtenir des informations structurales sur les protéines adsorbées et déshydratées sur la couche mince de SiO_2^{th} . Dans la prochaine section, on s'intéressera plus particulièrement à l'interaction entre les protéines sélectionnées et des substrats nanocomposites à base d'AgNPs et de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$. Cette étude servira notamment à apporter des informations supplémentaires sur l'influence des AgNPs ou de la couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ sur le processus d'adsorption des différentes protéines à leurs surfaces.

3. Étude de l'interaction entre les protéines et des modèles de couches minces nanocomposites à base de SiO₂ et d'AgNPs

3.1 Caractérisation morphologique et structurale de gouttelettes protéiques déposées sur des couches minces nanocomposites avec des AgNPs enterrées

La première analyse exposée ici a été effectuée à l'aide des gouttelettes protéiques utilisées dans la section 1 avec une configuration des substrats nanocomposites où les AgNPs se retrouvent enterrées à quelques nanomètres de la surface dans une matrice de SiO₂^{plasma} (Chapitre II- section 4.4.1). Le tableau IV-10 présente les mesures des angles de contact à t_{1s} obtenues avec des gouttelettes de SAB ou de Fn (0.05 g/L) et déposées sur des substrats nanocomposites.

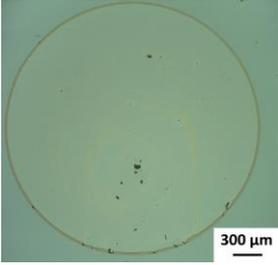
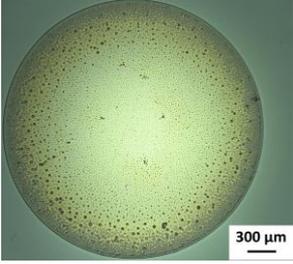
Substrats	Protéines (g/L)	Images des gouttelettes à 1s	Angle de contact θ ^A	Images optiques après déshydrations	Diamètre des gouttelettes déshydratées (d)
	Eau PPI (contrôle)		78.8° ± 0.53°	-	-
Procédé plasma	BSA 0.05		79.8° ± 0.3°		d= 2.6 mm
	Fn 0.05		80.3° ± 1.4°		d= 2.7 mm

Tableau IV-10 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB ou de Fn (0.05 g/L, pH=7.0) déposées sur les substrats nanocomposites possédant des AgNPs enterrées dans une matrice de SiO₂^{plasma} (mesures à 23 °C). Angles de contact (moyenne ± ET, n=3).

Comparés à la SiO₂th, on remarque que les angles de contact mesurés avec les nanocomposites sont plus élevés (SAB, θ_A = 79.8° ± 0.3° et Fn, 80.3° ± 1.40°). La mesure obtenue avec l'EPPI (θ_A = 78.8° ± 0.53°) confirme également le caractère plus hydrophobe de

cette couche de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans lequel sont enterrés les AgNPs, comparés à la couche mince de SiO_2^{th} . Le phénomène d'hystérésis de l'angle de contact observé avec la couche mince de SiO_2^{th} n'est plus observable en raison de la topographie de la surface. En effet, la couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans laquelle sont enterrées les AgNPs est très fine (quelques nm), et cette couche suit donc la conformation des AgNPs avec une surface légèrement vallonnée avec des pics et des vallées d'une profondeur d'environ 4 nm (Figure III-5) ce qui provoque l'effet d'« épinglement » de la gouttelette d'eau sur cette surface. L'aspect plus hydrophobe de la couche de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ est donc induit par la morphologie de la surface de la couche nanocomposite.

L'aspect visuel du dépôt déshydraté de SAB obtenu est uniforme. Visuellement, on observe également la présence d'une épaisseur plus importante au niveau des rebords du dépôt protéique. Concernant le dépôt déshydraté obtenu avec la Fn, on observe qu'il est plus hétérogène avec la présence de micro-amas qui sont plus nombreux au niveau des contours du dépôt. Le centre du dépôt semble plus homogène à cette concentration ($c= 0.05 \text{ g/L}$). Comme observé avec la SAB, l'épaisseur du rebord du dépôt paraît plus importante avec un aspect plus marqué et plus sombre que dans le centre. Avec les deux protéines utilisées, le diamètre des gouttelettes déshydratées est atteint immédiatement après le dépôt des gouttelettes sur les nanocomposites et ce diamètre reste inchangé durant le processus de déshydratation. On obtient un diamètre de 2.6 mm avec la SAB et de 2.7 mm avec la Fn.

Si l'on s'intéresse maintenant à la cinétique de déshydratation des gouttelettes protéiques de SAB et de Fn sur les substrats nanocomposites, on s'aperçoit que le processus de déshydratation est linéaire durant tout le processus. La durée de déshydratation des gouttelettes protéiques est légèrement plus rapide avec la Fn qu'avec la SAB (20 min vs 23 min, respectivement) (Fig IV-17). Avec l'EPPI, la déshydratation est moins prononcée et dure plus longtemps qu'avec les gouttelettes protéiques (28 min).

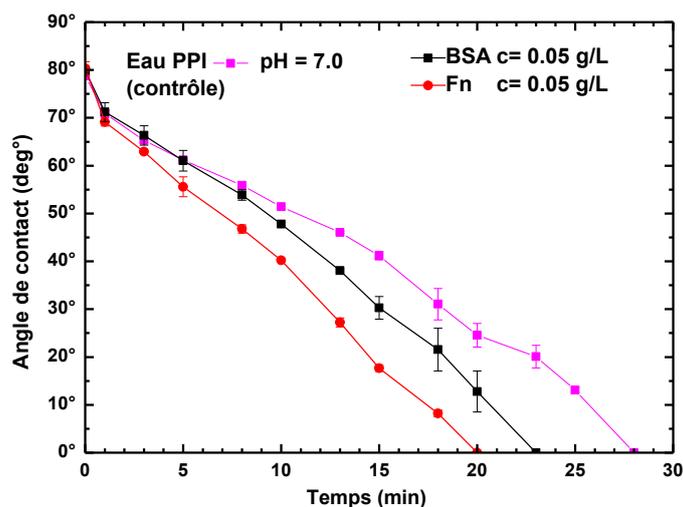


Figure IV-17 : Évolution de la mesure de l'angle de contact de gouttelettes de SAB ou de Fn durant le processus de déshydratation, (moyenne \pm ET, n=3). Les gouttelettes protéiques (0.05g/L) ont été déposées sur une couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans laquelle sont enterrées des AgNPs.

3.2 Caractérisation morphologique et structurale des protéines adsorbées et déshydratées sur des couches minces nanocomposites avec des AgNPs exposées à la surface

Dans la deuxième configuration des substrats nanocomposites utilisés, les AgNPs se retrouvent exposées à la surface et peuvent donc entrer en contact direct avec les différentes protéines utilisées (Chapitre II- section 4.4.2). Le Tableau IV-11 présente les mesures des angles de contact à t_{1s} obtenus avec l'EPPI et des gouttelettes de SAB et de Fn ($c= 0.05 \text{ g/L}$) déposées sur une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Un angle de contact égal à $110.09^\circ \pm 0.2^\circ$ est observé avec une gouttelette d'EPPI démontrant le caractère très hydrophobe de la monocouche d'AgNPs. En présence de SAB (0.05 g/L), on assiste à une légère diminution de l'angle de contact ($\theta_A = 108.9^\circ \pm 0.3^\circ$) à t_{1s} . En revanche, avec la solution de Fn à cette même concentration, on assiste à une augmentation de l'angle de contact ($117^\circ \pm 3.6^\circ$).

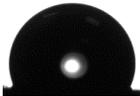
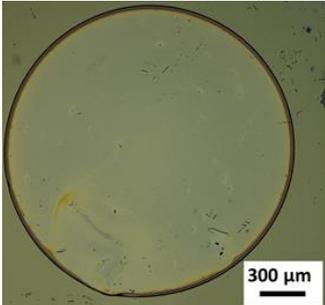
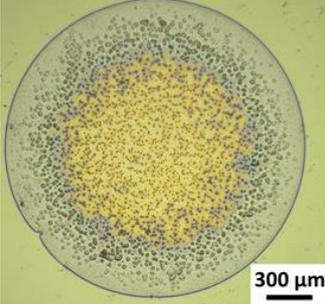
	Concentration protéique (g/L)	Images optiques des gouttelettes à 1s	Contact angle - Θ_A	Images optiques des dépôts protéiques	Diamètre des gouttelettes déshydratées
	Control pH=7.0		110.09° ± 0.2°	-	-
BSA	0.05		108.9° ± 0.30°		$d = 1.9 \text{ mm}$
Fn	0.05		117.7° ± 3.6°		$d = 1.9 \text{ mm}$

Tableau IV-11 : Caractéristiques des gouttelettes de SAB et de Fn (0.05 g/L, pH=7.0) déposées à la surface des substrats nanocomposites avec des AgNPs exposées à la surface (mesures à 23 °C). Angles de contact (moyenne ± ET, n=3)

Les images optiques des gouttelettes protéiques déshydratées sur la surface des nanocomposites sont également présentées dans le tableau IV-11. Avec cette même concentration de SAB ($c = 0.05 \text{ g/L}$), l'aspect visuel du dépôt protéique obtenu est homogène avec également une épaisseur plus importante au niveau des rebords de la gouttelette déshydratée. Avec la Fn, l'aspect visuel du dépôt protéique est moins homogène et l'on observe la présence de nombreux amas et d'objets distincts qui tendent à se concentrer vers le centre du dépôt. Les diamètres des différents dépôts protéiques sont obtenus immédiatement après le dépôt des gouttelettes protéiques et restent inchangés durant le processus de déshydratation. Le diamètre du dépôt déshydraté de SAB ou de Fn est sensiblement le même et il est égal à 1.9 mm. Si l'on s'intéresse maintenant au processus de déshydratation des gouttelettes de Fn et de SAB ($c = 0.05 \text{ g/L}$) déposées sur la monocouche d'AgNPs, on s'aperçoit que le temps de déshydratation des gouttelettes d'EPPI et de SAB est identique et est plus long qu'avec les gouttelettes de Fn (20 min vs 15 min, respectivement) (Fig. IV-18).

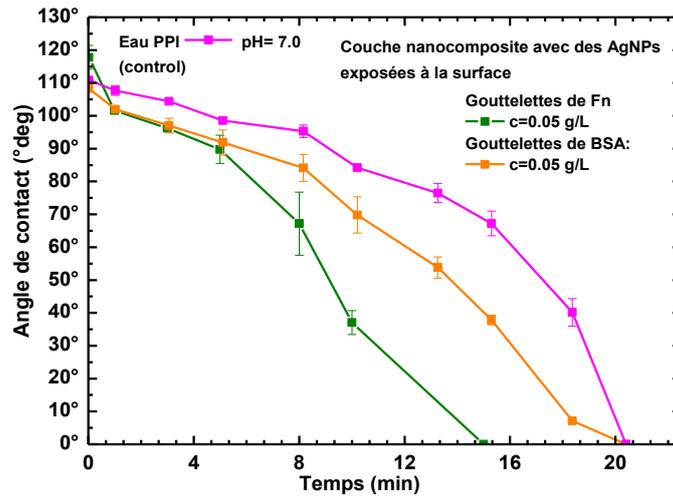


Figure IV-18 : Évolution de la mesure de l'angle de contact de gouttelettes de SAB et de Fn ($c= 0.05 \text{ g/L}$) en fonction du temps sur la SiO_2 avec présence d'une monocouche d'AgNPs exposées à la surface (moyenne \pm ET, $n=3$).

Comparé aux résultats obtenus avec la couche mince de SiO_2^{th} , le phénomène d'hystérésis de l'angle de contact n'est pas présent avec les gouttelettes d'EPPI. En effet, on assiste à une déshydratation presque linéaire des gouttelettes d'EPPI déposées sur la monocouche d'AgNPs. Ce comportement est dû à la morphologie de la surface qui dans ce cas présente des différences d'environ 15 nm entre les pics et les vallées suite à la taille des AgNPs (l'axe mineur de 15 nm).

La morphologie des différentes gouttelettes protéiques déposées et déshydratées a été étudiée par observation au MEB. Les figures IV-19 et 20 présentent les images MEB du rebord et du centre d'une gouttelette de SAB ou de Fn ($c= 0.05 \text{ g/L}$) adsorbées et déshydratées à la surface des substrats nanocomposites possédant une monocouche d'AgNPs exposées à leur surface. Avec la SAB (figures IV-19), l'aspect visuel du dépôt déshydraté est homogène et relativement lisse. Au niveau du rebord du dépôt, on observe une nette délimitation entre le rebord et la surface du substrat nanocomposite. Au centre du dépôt, la présence de petits amas protéiques est observable.

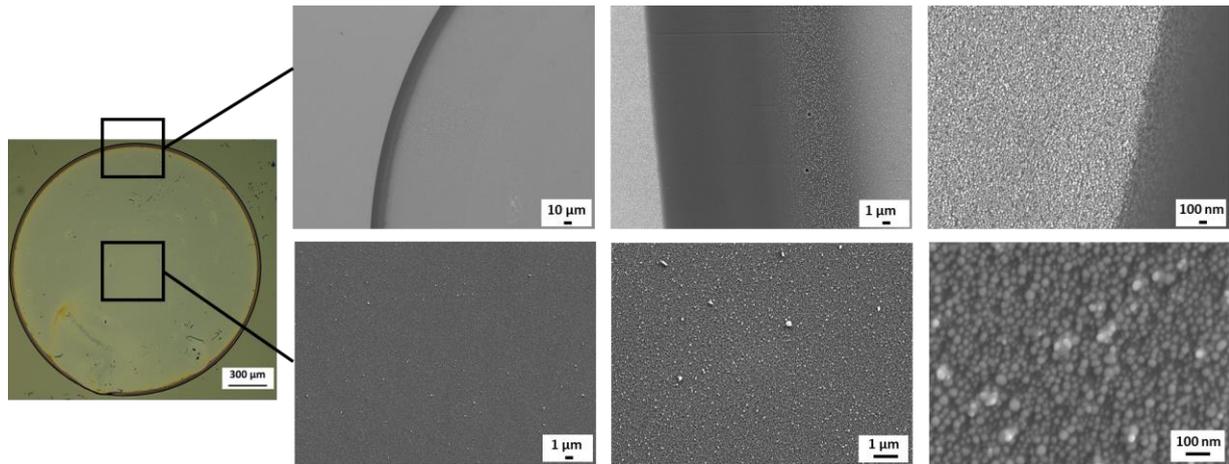


Figure IV-19 : Images MEB d'une gouttelette de SAB ($c= 0.05$ g/L) déshydratée à la surface du substrat nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de SAB déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 300$, $\times 3000$, $\times 30\ 000$, respectivement. Ligne du bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de SAB déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 3000$, $\times 10\ 000$, $\times 100\ 000$, respectivement.

Dans le cas des gouttelettes déshydratées de Fn (figures IV-20), l'aspect visuel des dépôts est complètement différent. En effet, la nette délimitation du rebord observée avec la SAB est également visible avec la Fn ; cependant on peut remarquer, vers l'extérieur, mais à proximité du rebord du dépôt, une deuxième ligne de délimitation (Fig. IV-20, ligne du haut). Dans cet espace, la présence de nombreux cristaux de NaCl est notée (éléments blancs ; confirmé par EDX). Dans la bande plus foncée correspondant au rebord, on peut également observer des cristaux de NaCl qui possèdent une taille plus importante. Comme évoqué précédemment dans la section 1.2, les cristaux de NaCl proviennent du tampon de conditionnement de la Fn.

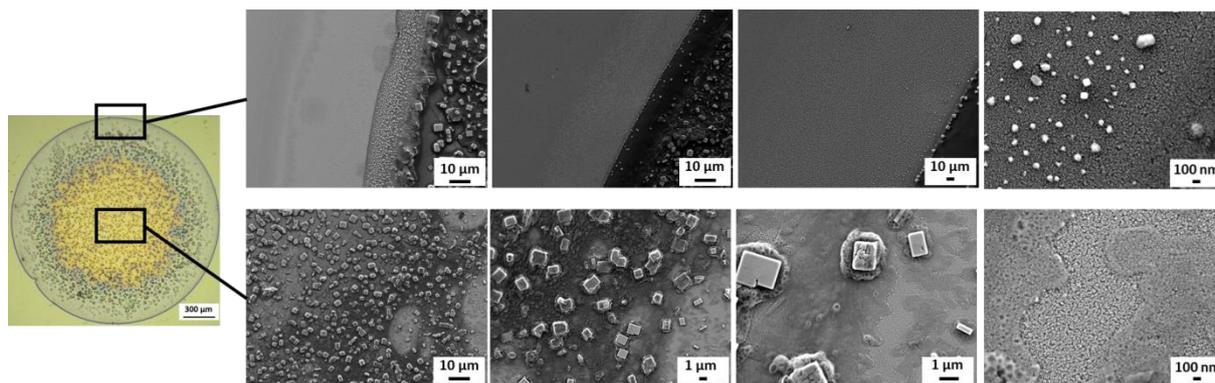


Figure IV-20 : Images MEB d'une gouttelette de Fn ($c = 0.05$ g/L) déshydratée à la surface du substrat nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Ligne du haut : Images correspondant au zoom au niveau du rebord d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur la ligne du haut correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 1000$, $\times 1000$, $\times 3000$, $\times 30\ 000$, respectivement. Ligne du Bas : Images correspondant au zoom au niveau du centre d'une gouttelette de Fn déshydratée. Les images successives sur ligne du bas correspondent à l'augmentation du grossissement $\times 1000$, $\times 3000$, $\times 10\ 000$, $\times 30\ 000$, respectivement.

Si l'on s'intéresse maintenant au centre du dépôt, de nombreux cristaux de NaCl sont présents, sous lesquels des agrégats de Fn sont observés. En dessous de ces cristaux, la présence d'une couche de Fn qui tend à se concentrer autour de ces cristaux est observée. À forte résolution, la couche de Fn présente au centre peut également apparaître discontinue.

Les figure IV-21 et 22 présentent les images MEB obtenues à résolution supérieure, avec une couche mince de SAB ou de Fn ($c = 0.05$ g/L) adsorbées et déshydratées à la surface de substrats nanocomposites possédant une monocouche d'AgNPs exposées à leur surface.

Dans le cas de la SAB (Fig. IV-21), de nombreux amas protéiques d'une taille de 100 nm environ sont observés. Un recouvrement des AgNPs par les amas de la SAB est également noté.

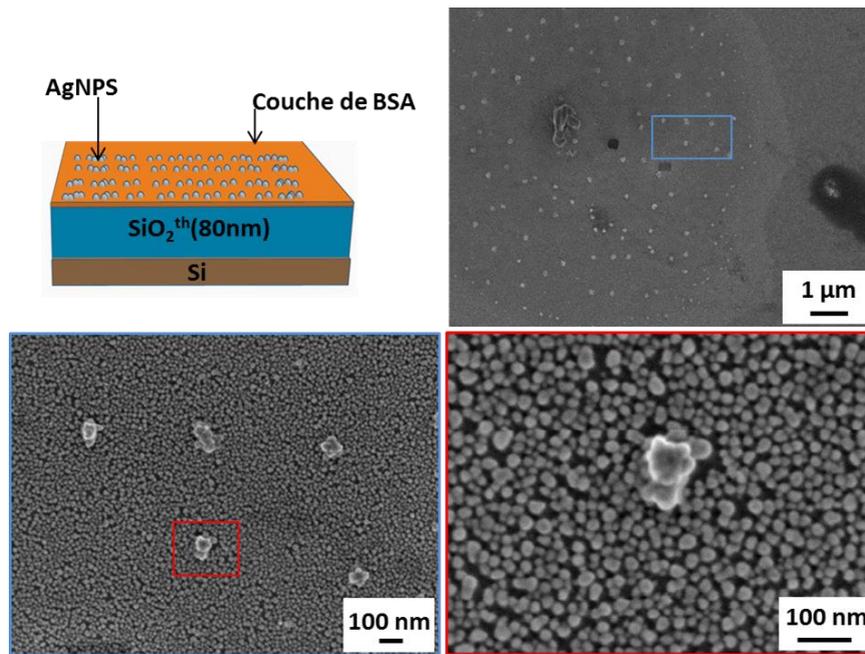


Figure IV-21 : Images MEB d'une couche mince de SAB (0.05 g/L) sur substrat nanocomposite avec des AgNPs exposées à la surface.

Dans le cas de la Fn, on observe également la présence d'amas protéiques (Fig. IV-22). Cependant, l'englobement des AgNPs dans les amas de Fn est plus marqué. De plus, les AgNPs peuvent être déplacées de leur localisation initiale pour se concentrer au centre des amas protéiques. En effet, autour des amas de Fn des espaces vides correspondant à la localisation initiale des AgNPs peuvent être observés. La formation de ces structures Fn-AgNPs est sûrement due à une interaction forte entre les molécules de Fn et les AgNPs. On remarque également la présence de structures fibreuses autour des amas qui les relient aux autres AgNPs présentes autour. La Fn semble s'étaler également sur la monocouche d'AgNPs. L'interaction spécifique observée entre la Fn et les AgNPs peut être due à la nature de la Fn, mais également à sa taille plus importante comparée à la SAB (70 nm vs 14 nm, respectivement) et à la taille des AgNPs (axe majeur de 19 nm).

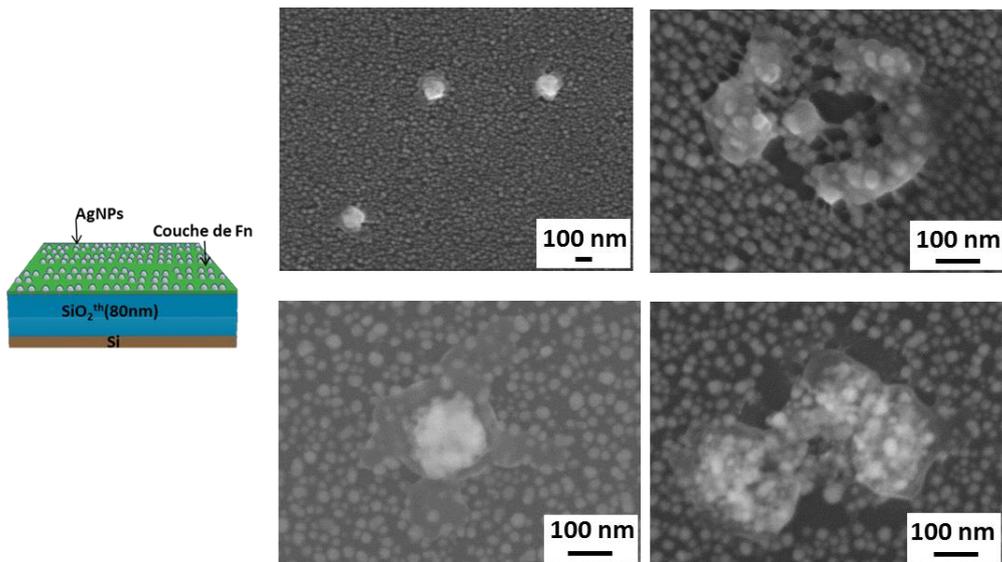


Figure IV-22 : Images MEB d'une couche mince de Fn (0.05 g/L) sur substrat nanocomposite avec des AgNPs exposées à la surface.

Dans cette troisième section, l'interaction entre des protéines (SAB ou Fn) et les différents substrats nanocomposites a été évaluée. Des mesures d'angle de contact des gouttelettes protéiques, mais également des analyses MEB des différents dépôts protéiques résultant ont été effectuées. Dans la section suivante, on s'intéressa à l'interaction entre des gouttelettes de suspension de *C. albicans* et la SiO_2^{th} . Cette dernière étude nous permettra d'obtenir des informations sur l'interaction de plus grandes particules, dans notre cas des microorganismes, contenues dans une gouttelette d'EPPI.

4 Dépôts de microorganismes : Adsorption et images optiques de gouttelettes de suspension de *C. albicans* déshydratées sur une couche mince de SiO_2^{th}

Des gouttelettes de suspension de *C. albicans* ont été déposées sur une couche mince de SiO_2^{th} et la mesure de l'angle de contact a été suivie au cours du processus de déshydratation. Le tableau IV-12 présente les mesures des angles de contact à t_{1s} obtenus avec des gouttelettes de suspension de *C. albicans* provenant de cultures de 48H à 22.5 °C ou 37 °C. Les suspensions microbiennes ont également été utilisées telles quelles ou après filtration afin de pouvoir étudier l'influence de la morphologie : cellules unitaires ou combinaison des différentes morphologies observées pour *C. albicans* (hyphes, pseudo-hyphes ou cellules bourgeonnantes ou associées).

	Gouttelettes de <i>C. albicans</i>	Culture cellulaire de 48H à T = 22.5°C		Culture cellulaire de 48H à T = 37°C	
	[UFC/ML]	Images des gouttelettes à 1s	Angle de contact - θ_A	Images des gouttelettes à 1s	Angle de contact - θ_A
Culture cellulaire non filtrée	DO _{600nm} = 4.2*10 ⁶		29.5° ±2.2°		39.7° ±0.1°
Culture cellulaire filtrée	DO _{600nm} = 4.2*10 ⁶		33.6° ±2.1°		40.7° ±0.8°

Tableau IV-12 : Angles de contact de gouttelettes de suspension de *C. albicans* (culture 48H à 22.5 °C ou 37 °C) déposée sur une couche mince de SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).

Sur l'ensemble des paramètres testés (filtration et température), les valeurs des angles de contact sont comprises entre 29.5° et 40.5° et sont donc largement inférieures à la valeur mesurée avec l'EPPI ($\theta_A = 58.1^\circ$) ou les solutions protéiques ($\theta_A = 59.8^\circ$). La température d'incubation de la culture cellulaire influence également l'angle de contact des gouttelettes de *C. albicans*. En effet, pour une incubation réalisée à 22.5 °C (filtrée ou non), les valeurs des angles de contact sont inférieures aux valeurs retrouvées pour une incubation à 37 °C. On peut s'apercevoir également que la filtration n'affecte que très légèrement les valeurs des angles de contact en fonction de la température de culture sélectionnée (Tab. IV-12). La figure IV-23 présente les valeurs des angles de contact mesurées au cours du processus de déshydratation des gouttelettes de suspensions de *C. albicans* de cultures de 48H à 22 °C ou 37 °C, filtrées ou non.

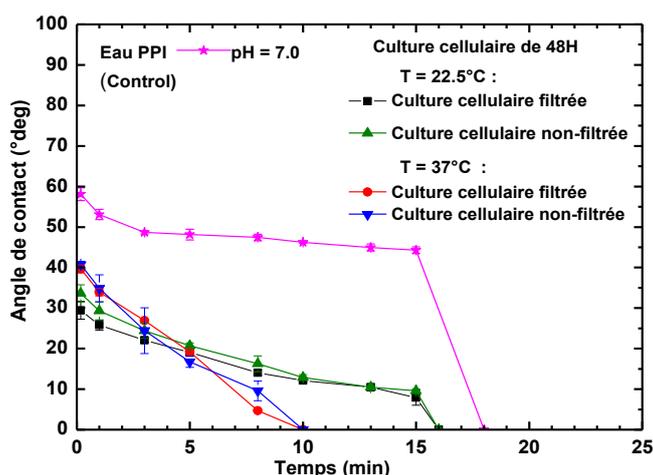


Figure IV-23 : Mesures de l'angle de contact à 23 °C au cours du processus de déshydratation des gouttelettes de suspension de *C. albicans* (culture 48H à 22.5 °C ou 37°C, filtrée ou non) sur une couche mince de SiO₂th (moyenne ± ET, n=3).

La déshydratation des gouttelettes de *C. albicans* se produit de manière linéaire. Avec les suspensions provenant de *C. albicans* cultivé à 22.5 °C la déshydratation des gouttelettes dure 10 min. Pour une culture incubée à 37 °C, le processus de déshydratation est plus long et dure 16 min. Ces résultats indiquent un comportement différent des cellules selon la température d'incubation de la culture initiale. Les observations en microscopie optique ainsi que l'absence de différence entre les suspensions non filtrées et filtrées confirment que des différences de morphologie ne sont pas impliquées. La littérature souligne le caractère température dépendant de l'expression de certaines adhésines de *Candida* sp. et *C. albicans*, ainsi que de l'hydrophobicité globale au niveau cellulaire (Würzner *et al.*, 1996; Szabelska *et al.*, 2006). Les dépôts résultants de la déshydratation d'une gouttelette de suspension de *C. albicans* provenant d'une culture de 48 H à 37 °C et déposée sur une couche mince de SiO₂th sont présentés dans figure IV-24.

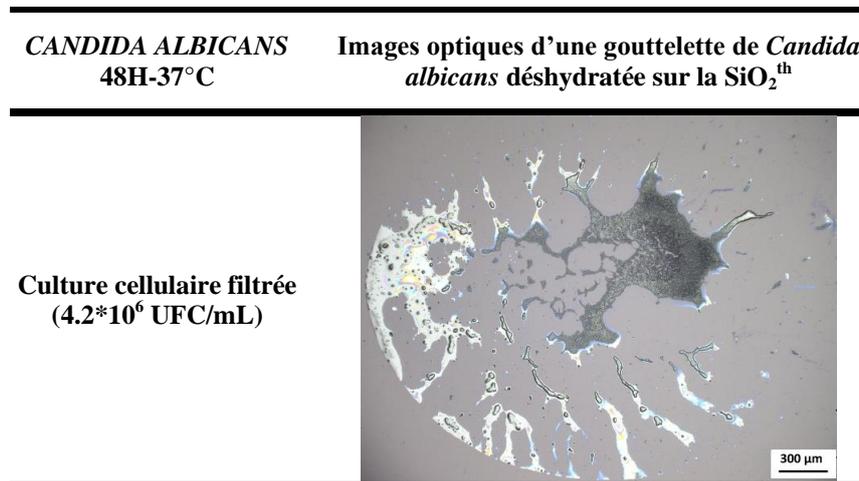


Figure IV-24 : Image optique de gouttelettes déshydratées de suspension de *C. albicans* filtrée provenant d'une culture de 48H à 37 °C et déposées sur une couche mince de SiO₂th.

La formation d'un dépôt non uniforme et structuré est notée avec des zones de concentration des microorganismes. Cette organisation des dépôts cellulaires à la surface de la SiO₂th est complètement différente de l'organisation des différents dépôts obtenus avec les protéines.

Cette dernière section constitue une première approche du comportement de microorganismes sur la SiO₂th, après déshydratation. Les études réalisées au niveau optique et

moléculaire sur les protéines, en lien avec leur adsorption sur différentes surfaces et leur comportement lors de la phase de déshydratation, devraient nous permettre une transposition lors de l'interaction microorganisme/surface, voire microorganisme/protéine/surface. L'intérêt de ce travail repose alors sur la perspective d'évaluation du changement de conformation des protéines dans deux conditions représentatives de la pratique : adsorbées et déshydratées avant contact avec les microorganismes ; co-déposées avec les microorganismes. L'approche serait originale par rapport à l'étude des sites de liaisons ligand-récepteur décrite dans la littérature (Willaert, 2018).

Dans ce chapitre, nous avons étudié le processus d'adsorption et de déshydratation de la DsRed, de la SAB et de la Fn à la surface de couche mince de SiO₂th et de différents substrats nanocomposites. Cette étude a été effectuée afin d'apporter des informations supplémentaires sur la stabilité structurale de différents types de protéines adsorbées et déshydratées. Les substrats nanocomposites utilisés possèdent une monocouche d'AgNPs exposées à leur surface ou des AgNPs enterrées à quelques nanomètres de la surface dans une matrice de SiO₂^{plasma}. L'organisation des protéines adsorbées et déshydratées a été analysée en utilisant notamment des gouttelettes protéiques ou des couches minces protéiques. Les gouttelettes protéiques ont été déposées à la surface des différents échantillons et leur déshydratation a été suivie au cours du temps. Les mesures des angles de contact des gouttelettes possédant différentes concentrations protéiques ont montré une interaction hydrophile avec la surface de SiO₂th. Cependant, en augmentant la concentration protéique des gouttelettes, l'angle de contact mesuré augmente également. En ce qui concerne les mesures effectuées avec des gouttelettes de DsRed ou de SAB à différent pH déposées sur la SiO₂th, les résultats ont montré que l'angle de contact augmentait pour des pH très acides ou très basiques. Néanmoins la DsRed a été trouvée stable dans une large gamme de pH (4 à 11). Sur les différents substrats nanocomposites, les mesures des angles de contact des gouttelettes protéiques déposées ont montré une interaction plus hydrophobe suite à de la morphologie de la surface. Afin de mieux comprendre les interactions impliquées dans le mécanisme d'adsorption et de déshydratation des protéines à la surface des différents échantillons, les dépôts protéiques ont été analysés en utilisant notamment la microscopie optique, électronique, l'ellipsométrie et la spectroscopie FTIR. L'évolution de l'épaisseur des différentes couches protéiques obtenues en faisant varier la concentration des solutions a été suivie *ex-situ* en utilisant l'ellipsométrie. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence la formation dynamique des couches minces protéiques sur la SiO₂th. De plus, la possibilité d'un contrôle précis de l'épaisseur des couches

protéiques formées en ajustant la concentration des différentes solutions protéiques a également été mise en évidence. Les mesures des angles de contact d'EPPI ont également été réalisées sur les couches minces protéiques et ont montré des valeurs qui augmentaient en même temps que l'épaisseur des couches protéiques élaborées, comparé à la couche mince de SiO₂th seule. L'analyse réalisée par AFM nous a également fourni des informations sur la morphologie des couches minces protéiques adsorbées et déshydratées sur la SiO₂th. La morphologie des couches minces protéiques déshydratées variait également en fonction de la nature de la protéine utilisée. Les images obtenues par AFM ont révélé également une organisation protéique sous la forme d'un réseau de type « dentelle » avec la SAB, des structures sous forme de « tiges » avec la DsRed et de type « ramifications » avec la Fn. Les informations obtenues par FTIR (présence des bandes Amide I et II pour les deux couches minces protéiques) suggèrent une conservation de la structure secondaire des protéines et dans le cas de la DsRed de son chromophore. L'ensemble des résultats acquis durant cette étude montre bien comment la présence des protéines adsorbées et déshydratées peut influencer les propriétés physico-chimiques des surfaces solides sur lesquelles elles ont adhéré.

Nous avons également initié l'évaluation du comportement de *C. albicans* ; dans ce cas, les mesures des angles de contact réalisées sur la SiO₂th avec des gouttelettes de suspension de microorganismes sont moins élevées qu'avec les protéines. La démarche mise en place pour le suivi du comportement des protéines au cours de l'adsorption et de la déshydratation pourrait être développée sur le modèle cellules/surface.

Chapitre V : Adhésion de *C. albicans* sur des nanocomposites à base d'AgNPs et de SiO₂ avec ou sans la présence d'une couche mince protéique adsorbée et déshydratée

Depuis plusieurs années, les céramiques à base de SiO₂ suscitent un grand intérêt dans le domaine biomédical. En raison de son utilisation pour la conception d'implants à revêtement antimicrobien ou encore de systèmes de marquage et d'administration de médicaments *in vivo*, la SiO₂ représente un matériau adapté à un usage biomédical. De plus, la FDA (Food Drug Administration) a classé la SiO₂ parmi les agents « généralement considérés comme sûrs » (GRAS), ce qui en fait un candidat idéal pour de nombreuses applications (Ha *et al.*, 2013). *In vivo*, lorsque les différents dispositifs médicaux entrent en contact direct avec des fluides physiologiques, l'un des premiers processus à se produire est l'adsorption des protéines à la surface du matériau. Cette couche peut être composée d'albumine, de fraction du complément C3, d'immunoglobulines, de fibrine, de collagène de type IV, de fibronectine, etc. En général, la quantité adsorbée, le taux d'adsorption et la stabilité de la couche formée dépendent des caractéristiques physico-chimiques de la protéine, de la surface du substrat sélectionné et de l'environnement de l'interaction (Vermeer et Norde, 2000; Norde et Giacomelli, 2000). Différentes étapes sont impliquées dans la fixation des protéines sur des surfaces solides. Au début du processus, les protéines diffusent de la solution vers l'interface et elles adhèrent ensuite à la surface solide par une combinaison de forces électrostatiques et hydrophobes (Benavidez *et al.*, 2015). En particulier, les acides aminés basiques (Arg et Lys) sont supposés être essentiels pour établir des interactions électrostatiques avec la surface de la SiO₂. Cette première étape est considérée comme réversible. La deuxième étape du processus d'adsorption est supposée dépendre du degré de « dureté-douceur » des protéines (Mathé *et al.*, 2013). Au cours de la dynamique d'organisation des protéines sur la surface, des interactions peuvent se produire entre les sites hydrophiles de la SiO₂ et les résidus hydrophobes de la protéine exposée à sa surface (Vogler, 2012). Cette deuxième étape est souvent considérée comme irréversible. Une fois les protéines adhérentes sur la surface, la conformation et la disposition des protéines adsorbées peuvent en outre influencer les processus biologiques subséquents et déterminer ainsi la réponse biologique au matériau. Les protéines peuvent ainsi améliorer « l'ancrage » des microorganismes à la surface par le biais d'interactions ligand-

récepteur ou acide / base de Lewis. Elles peuvent au contraire limiter l'adhésion microbienne par des interactions répulsives, le plus souvent électrostatiques.

Si l'on s'intéresse aux propriétés de deux protéines (SAB et Fn) utilisées dans cette étude, la littérature indique que l'albumine adsorbée aurait un effet inhibiteur sur l'adhésion bactérienne aux polymères, aux céramiques et aux métaux (A. Utracki, 1993; Senaratne *et al.*, 2005). Cependant, peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'influence de la SAB adsorbée et déshydratée sur l'adhésion de levures. A l'inverse, la littérature indique que la fibronectine semble augmenter l'adhésion et la propagation de différents types de cellules (fibroblastes, bactéries...) sur des substrats inertes (verre ou plastique) ou biologiques (Herrmann *et al.*, 1988; Yamada-Okabe *et al.*, 1999).

Le film de conditionnement, en recouvrant le biomatériau, modifie ses propriétés physicochimiques de surface telles que son hydrophilie (Chapitre 4), sa charge de surface ou sa rugosité (Van Haecht *et al.*, 1985; Oss and Naim, 1996). D'autre part, l'adsorption protéique peut favoriser l'adhésion microbienne en raison d'une affinité particulière entre la protéine et des récepteurs de surface spécifiques de l'espèce microbienne (Pringle and Fletcher, 1986; Herrmann *et al.*, 1988; Ostuni *et al.*, 2001; Katsikogianni and Missirlis, 2004; Tang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009). Ainsi, l'adhésion microbienne peut être tout à fait comparée à l'adsorption des protéines décrites précédemment, avec mise en jeu des mêmes types d'interactions et la démonstration d'une phase réversible et d'une phase irréversible. Les micro-organismes ayant adhéré à la surface du matériau peuvent ensuite proliférer sous forme adhérente et ainsi former un biofilm. Au cours de la formation de ces structures complexes, et en lien avec celle-ci, les micro-organismes développent une tolérance spécifique aux biocides ou antibiotiques, induisant de graves problèmes de santé publique avec des retombées économiques majeures. Les infections fongiques sont le plus souvent causées par les espèces pathogènes appartenant au genre *Candida*, en particulier *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, considérés comme des agents pathogènes nosocomiaux de plus en plus importants. Nous nous sommes intéressés à la levure *C. albicans*, principal agent pathogène, qui peut se développer sous forme de levures ovales, sous forme d'hyphes septés continus ou de pseudohyphae (Norde et Giacomelli, 2000).

Ainsi, ce chapitre est dédié à l'évaluation du profil de détachement de *C. albicans* sur des couches minces de SiO₂th seules ou en présence d'AgNPs exposées ou enterrées dans une couche de SiO₂^{plasma}. Nous avons également exploré l'influence d'une couche mince de SAB ou de Fn adsorbée et déshydratée à la surface de nos différents nanocomposites sur les forces

d'adhésion de *C. albicans*. Les différents profils de détachement ont été déterminés dans des conditions hydrodynamiques contrôlées en utilisant notamment une chambre à écoulement cisailé. L'utilisation de la chambre à écoulement cisailé a permis également d'évaluer le détachement de *C. albicans* en appliquant une gamme très large de contraintes de cisaillement pariétales (0.01-83.12 Pa). L'originalité de ce travail repose sur l'exploration du détachement de *C. albicans* avec l'application de très faibles contraintes de cisaillement en présence de protéines adsorbées et déshydratées.

1. Évaluation du profil de détachement de *C. albicans* adhérent à la surface d'une couche mince de SiO₂th en présence ou non de protéines adsorbées

L'adhésion de *C. albicans* a été évaluée *in situ* à la surface d'une couche mince de SiO₂th (80-100 nm) élaborée sur un substrat intrinsèque de silicium et en utilisant une chambre à écoulement cisailé. L'influence de SAB ou de Fn adsorbées et déshydratées sur l'adhésion des levures a également été évaluée. Les profils de détachement cellulaire obtenu avec la couche mince de SiO₂th en présence ou non de SAB ou de Fn adsorbées et déshydratées à la surface de la couche mince de SiO₂th sont présentés dans la Fig. V-I.

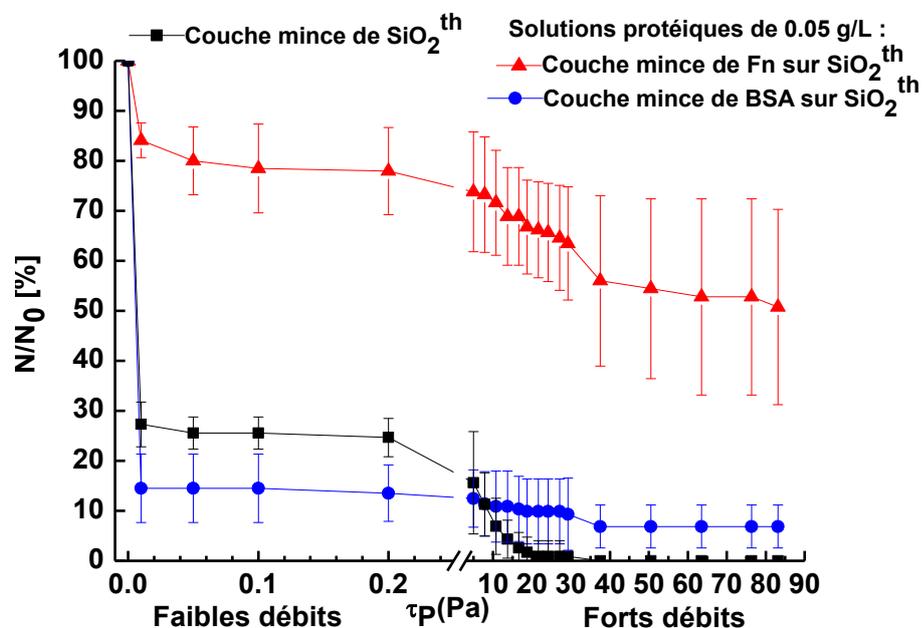


Figure V-I : Profils de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées : couche mince de SiO₂th seule (en noir), couche mince de SiO₂th avec une couche protéique de SAB (après adsorption et

déshydratation) (en bleu), couche mince de SiO₂th avec une couche protéique de Fn (après adsorption et déshydratation) (en rouge) (moyenne ± écart-type ; n = 3).

En ordonnée (y) est présenté le pourcentage de levures adhérees sur la surface (N/N_0 [%]), avec N le nombre de levures adhérees après application de la contrainte de cisaillement pariétale et N_0 le nombre de cellules initialement adhérees sur la couche mince de SiO₂th. Sur l'axe des abscisses (x) sont représentées les faibles contraintes de cisaillement pariétales obtenues en appliquant de faibles débits (0-0.20 Pa) et les fortes contraintes de cisaillement obtenues en appliquant de forts débits (5-83.12 Pa) dans la chambre à écoulement cisailé. Avec la couche mince de SiO₂th seule (courbe en noir), dès l'application de la première contrainte de cisaillement pariétale (0.01 Pa), la majorité des levures initialement adhérees se détachent (seulement 28 % de levures adhérees résiduelles). L'adhésion de ces levures est maintenue jusqu'à l'application de la contrainte de 0.2 Pa. Au-delà de cette contrainte, le nombre de levures adhérees diminue légèrement jusqu'au détachement total des levures avec l'application d'une contrainte de 37.50 Pa.

Les couches protéiques adsorbées et déshydratées ont été élaborées à partir d'une solution protéique de concentration égale à 0.05 g/L et de la méthode d'enduction par trempage (décrit dans le Chapitre II section 3). Les couches protéiques adsorbées et déshydratées utilisées correspondent à celles caractérisées dans le Chapitre IV. En fonction du type de protéines (SAB ou Fn) adsorbées et déshydratées sur la couche mince de SiO₂th, des changements significatifs au niveau de l'adhésion des levures sont observés. En effet, comparé aux mesures obtenues avec la SiO₂th seule (28 %), en présence de SAB, une diminution significative du pourcentage (14.5 %) de levures adhérees après l'application de la première contrainte de cisaillement pariétale (0.01 Pa) est notée. L'adhésion des levures est ensuite maintenue jusqu'à une valeur de contrainte de cisaillement pariétale de 5 Pa. Au-delà de cette valeur, une diminution du pourcentage de cellules adhérees (de 11 % à 6 %) est encore observée. Cependant, comparé à la couche mince de SiO₂th seule, le détachement cellulaire total n'est pas atteint même avec l'application de la contrainte maximale applicable avec le dispositif utilisé (83.12 Pa) (Fig. V-I).

Avec la couche mince de Fn, c'est un comportement différent qui est observé au niveau de l'adhésion et du détachement des levures. En effet, avec la Fn il y a trois fois plus de levures adhérees (84 %) qu'avec la couche mince de SiO₂th seule sous l'application de la première contrainte de cisaillement pariétale (0.01 Pa). L'adhésion de *C. albicans* est maintenue avec

une très légère diminution (84 % à 78 %) du pourcentage de cellules adhérentes jusqu'à l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétales (> 5 Pa). Sous l'application des plus fortes contraintes de cisaillement pariétal, on observe ensuite une légère diminution (73 % à 50 %) du pourcentage de levures adhérentes, sans toutefois atteindre un détachement total des levures.

Les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher 2 %, 50 % ou 90 % des levures initialement adhérentes sur les différents substrats sont présentées dans le tableau V-1.

Couche mince de SiO ₂ th	N ₀ (Cellules /cm ²)	τ _{p 2 %} (Pa)	τ _{p 50 %} (Pa)	τ _{p 90 %} (Pa)
SiO ₂ th	5.6*10 ⁴ ± 0.2*10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.60*10 ⁻²	9.0
SiO ₂ th + SAB (0.05 g/L)	6.5*10 ⁴ ± 0.4*10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.70*10 ⁻²	19
SiO ₂ th + Fn (0.05 g/L)	6.5*10 ⁴ ± 0.3*10 ⁴	0.1*10 ⁻²	N/A	N/A

Tableau V-1. Nombre de levures initialement adhérentes (N₀) sur la surface d'une couche mince de SiO₂th en présence ou absence de protéines de SAB ou Fn adsorbées et déshydratées (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % (τ_{p 2 %} (Pa)), 50 % (τ_{p 50 %} (Pa)) et 90 % (τ_{p 90 %} (Pa)) des levures initialement adhérentes.

D'après le tableau V-1, les contraintes nécessaires pour détacher 2 % ou 50 % des levures adhérentes sur la SiO₂th seule ou avec la SAB sont sensiblement les mêmes. La différence entre les deux surfaces apparaît pour le détachement de 90 % des levures (9 vs 19 Pa, respectivement).

Par opposition, en présence de Fn adsorbée, la contrainte de cisaillement nécessaire pour le détachement de 2 % des levures adhérentes est 10 fois plus importante qu'avec le SiO₂th seul ou avec la SAB. En présence de Fn, aucune contrainte de cisaillement testée ne permet de détacher 50 % ou 90 % des levures ; ceci en raison de la capacité maximale d'application de contraintes de la chambre à écoulement cisailé.

L'analyse des couches protéiques effectuée dans le chapitre IV nous a permis de montrer que la couche de SAB observée à la concentration étudiée était sous forme d'une monocouche organisée en réseau de type « dentelle » possédant des espaces vides entre les protéines. En augmentant les concentrations protéiques, on a pu constater que la couche protéique devient de plus en plus dense et complexe (Chapitre IV). Les espaces vides peuvent donc expliquer l'adhésion cellulaire observée et maintenue sous l'application des faibles contraintes de

cisaillement pariétal. Sous l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétal, la SAB pourrait cependant jouer un rôle « positif », en permettant un ancrage plus fort des levures. Avec la F_n c'est une amplification du phénomène d'adhésion des levures qui est soulignée. Cette interaction positive en termes d'adhésion initiale et de force d'adhésion sous de fortes contraintes de cisaillement est cohérente avec les données de la littérature sur cette protéine, très impliquée dans les interactions cellules/cellules.

2. Adhésion de *C. albicans* sur une couche mince nanocomposite avec des AgNPs exposées ou enterrées à l'intérieur d'une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$

La figure V-2 présente les différents profils de détachement cellulaire de *C. albicans* obtenus avec trois échantillons différents. Le premier échantillon est composé d'une couche mince de SiO_2^{th} , le second est composé d'une monocouche d'AgNPs (forme de sphéroïde prolate, taille : axe majeur 19.9 ± 10.0 nm, axe mineur 17.0 ± 7.5 nm, densité 1.7×10^{11} AgNPs/cm², taux de couverture de la surface 42.6 %) exposées à la surface de la couche mince de SiO_2^{th} et le troisième possède des AgNPs de même caractéristiques mais enterrées dans une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ à une distance contrôlée de 5.5 nm. Différents profils de détachement cellulaire sont observés en fonction du type d'échantillons utilisés. En effet, l'adhésion de *C. albicans* est beaucoup plus marquée (76 %) lorsque les AgNPs sont exposées à la surface (Fig. V-2, courbe en rouge) dès l'application de la première contrainte de cisaillement pariétale (0.01 Pa).

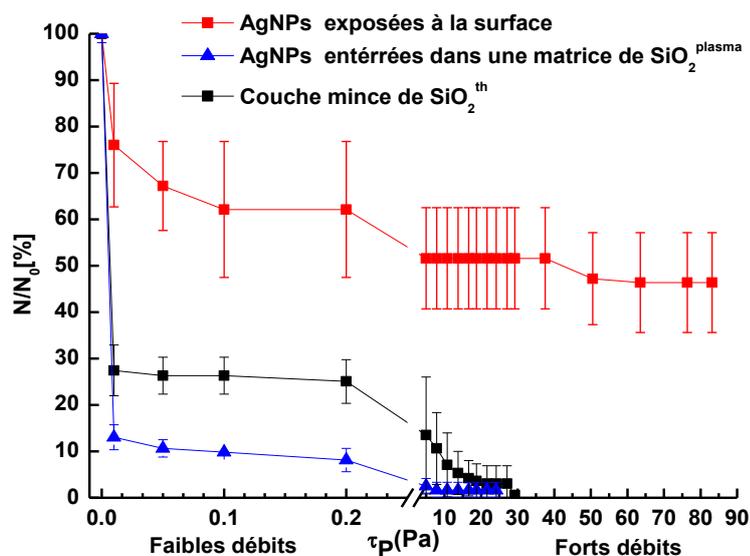


Figure V-2 : Profils de détachement de *C. albicans* sur différents nanocomposites à base de SiO₂ et d'AgNPs dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne ± écart-type ; n = 3).

En présence de la couche mince de SiO₂th seule ou avec les AgNPs enterrées dans la matrice de SiO₂^{plasma}, une diminution significative de l'adhésion cellulaire (28 % vs 13 %, courbes en noir et bleu respectivement) est observée dès l'application de la première contrainte de cisaillement (0.01 Pa). Si l'on s'intéresse maintenant à la cinétique de détachement des levures en présence des AgNPs exposées, on observe que l'adhésion des levures est maintenue même sous l'application de la contrainte maximale (46 % avec 83.12 Pa). En effet, on observe durant l'expérimentation une légère diminution du pourcentage de levures adhérees (76 % à 62 %) avec l'application des faibles débits (0.01-0.2 Pa), une seconde diminution (62 % à 46 %) dans les fortes contraintes et le maintien de l'adhésion des levures jusqu'à l'application de la contrainte maximale. Lorsque les AgNPs sont enterrées ou avec la couche mince de SiO₂th seule, c'est le comportement inverse qui est observé avec le détachement total des levures sous l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétales. Un détachement total des levures est obtenu avec l'application d'une contrainte de 27 Pa en présence des AgNPs enterrées et de 37.5 Pa avec la couche mince de SiO₂th seule.

Les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher 2 %, 50 % ou 90 % des levures initialement adhérees à la surface de SiO₂th seule ou associée à une monocouche d'AgNPs enterrées ou en surface sont présentées dans le tableau V-2.

Différents substrats nanocomposites	N ₀ (Cellules /cm ²)	t _{p 2 %} (Pa)	t _{p 50 %} (Pa)	t _{p 90 %} (Pa)
SiO ₂ th	5.6*10 ⁴ ± 0.2*10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.60*10 ⁻²	9.0
SiO ₂ th + AgNPs exposées	6.1*10 ⁴	0.8*10 ⁻³	42	N/A
SiO ₂ ^{plasma} + AgNPs enterrées	5.9*10 ⁴ ± *10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.6*10 ⁻²	0.10

Tableau V-2. Nombre de levures initialement adhérees (N₀) sur les différents substrats nanocomposites (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % (t_{p 2 %} (Pa)), 50 % (t_{p 50 %} (Pa)) et 90 % (t_{p 90 %} (Pa)) des levures.

D'après le tableau V-2, la présence des AgNPs exposées induit une contrainte de cisaillement plus importante pour le détachement de 2 %, 50 % et 90 % des levures adhérees comparé à la couche mince de SiO₂th seule ou à la matrice de SiO₂^{plasma} (AgNPs enterrées). La contrainte de cisaillement nécessaire pour le détachement de 50 % des levures adhérees est 70

fois plus importante. De plus, avec les AgNPs exposées, la contrainte nécessaire pour détacher 90 % des levures n'est pas atteinte dans les conditions de l'expérimentation.

La contrainte nécessaire pour détacher 2 % et 50 % des cellules est sensiblement la même pour la SiO_2^{th} et la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$. Le détachement de 90 % des levures adhérentes est atteint plus facilement avec la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ (0.10 Pa vs 9 Pa).

Les différences significatives observables avec les AgNPs exposées sont probablement induites par le contact direct avec les cellules. En effet, les AgNPs exposées peuvent augmenter les forces électrostatiques présentes à la surface de l'échantillon et provoquer de ce fait une adhésion des levures plus marquée et maintenue durant l'expérimentation. Les AgNPs sont connues pour leurs propriétés antimicrobiennes et les dommages qu'elles peuvent provoquer elles-mêmes ou par le relargage d' Ag^+ au niveau de la membrane cellulaire et des constituants cellulaires. Nous avons donc évalué la viabilité des levures ayant adhéré à la surface des différents échantillons par marquage au SYTO-9 et à l'IP. Dans un premier temps nous avons contrôlé la préservation de la viabilité cellulaire après 1h30 dans l'EPPI en présence ou non des marqueurs fluorescents. Les pourcentages respectifs de viabilité sont de 90% et 88% et sont disponibles dans l'Annexe B. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la viabilité cellulaire avant et après 1h30 de contact avec les surfaces nanocomposites. La figure V-3 présente le pourcentage de cellules viables et non viables au début de l'injection ou adhérentes sur la monocouche d'AgNPs exposée à la surface.

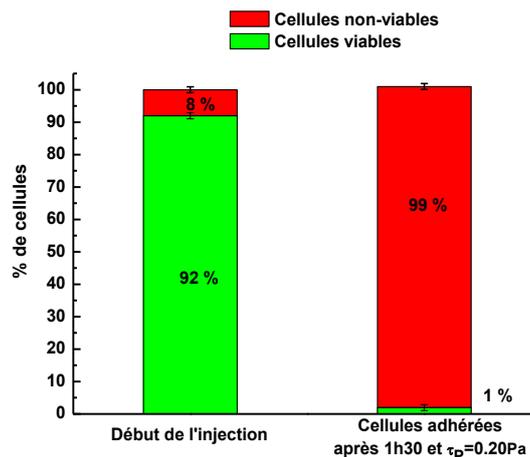


Figure V-3 : Pourcentages de levures viables et non viables au début de l'expérimentation et après la phase d'adhésion à la surface du nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs exposées à la surface. Les cellules vivantes sont représentées en vert et les cellules endommagées ou mortes en rouge. Les pourcentages de levures viables ou non, présentes au début de l'expérimentation ont été calculés sur une moyenne de 335 levures. Les pourcentages ont été calculés sur une moyenne de 150 levures après l'application d'une contrainte de cisaillement de 0.2 Pa (moyenne \pm écart-type ; n = 3).

Au début de l'expérimentation (juste après l'injection des levures dans la chambre) et en présence des AgNPs exposées, on observe que la majorité des levures sont viables (92 %). Après 1h30 en condition statique dans la chambre, et l'application d'une contrainte de 0.2 Pa, il ne reste que 1 % de levures viables contre 99 % de levures non viables adhérentes.

La figure V-4 présente le pourcentage de cellules viables et non viables au début de l'injection ou adhérentes à la surface de la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans laquelle des AgNPs sont enterrées à une très faible profondeur (5.5 nm). La majorité des levures sont viables (95 %) au début de l'expérimentation. Après 1h30 en condition statique, il ne reste que 8.5 % de levures viables adhérentes et 91.5 % des levures adhérentes sont non viables ou endommagées.

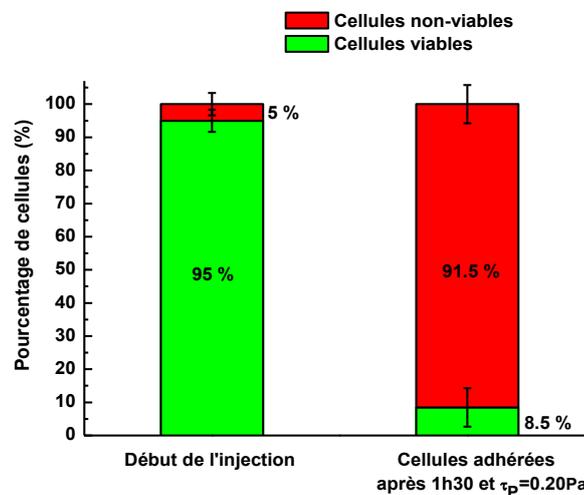


Figure V-4 : Pourcentages de levures viables et non viables au début de l'expérimentation et après la phase d'adhésion à la surface du nanocomposite possédant une monocouche d'AgNPs enterrées sous la surface. Les cellules viables sont représentées en vert et les cellules non viables ou endommagées en rouge. Les pourcentages de cellules viables ou non présentes au début de l'expérimentation ont été calculés sur une moyenne de 317 levures. Les pourcentages de cellules adhérentes sur le nanocomposite ont été calculés sur une moyenne de 110 levures après l'application d'une contrainte de 0.2 Pa, (moyenne \pm écart-type ; n = 3).

En résumé, l'adhésion des levures est marquée et maintenue lorsque les levures peuvent rentrer en contact direct avec la monocouche d'AgNPs exposées à la surface, même si ce contact entraîne une perte de viabilité des cellules. En revanche, cette adhésion n'est plus soutenue lorsque les AgNPs sont enterrées ou en leurs absences (couche mince de SiO_2^{th} seule). Un détachement total des levures peut être observé dans ces deux dernières configurations, en fonction des contraintes de cisaillement. Cependant, les résultats de viabilité cellulaire démontrent une perte de viabilité élevée et relativement similaire après la phase d'adhésion de 1h30 (conditions statiques) pour les deux types de monocouches d'AgNPs (exposées ou enterrées). Ces résultats suggèrent que le contact direct entre les levures et les AgNPs affecte

rapidement l'intégrité des membranes. Dans la configuration des AgNPs enterrées, les dommages cellulaires peuvent s'expliquer par le relargage progressif des Ag^+ après oxydation des AgNPs, mais contrôlé par l'épaisseur de la couche de couverture et donc d'expression progressive sur la durée de contact. Lorsque les AgNPs sont recouvertes par une couche mince de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$, on arrive ainsi à obtenir une adhésion des levures très limitée due aux propriétés antiadhésives de la silice tout en conservant l'effet antimicrobien des AgNPs.

3. Influence des protéines (SAB ou Fn) adsorbées et déshydratées à la surface des différents substrats nanocomposites sur l'adhésion de *C. albicans*

3.1 Adhésion de *C. albicans* en présence de de SAB adsorbée et déshydratée à la surface des nanocomposites

La figure V-5 montre les différents profils de détachement de *C. albicans* obtenus sur une couche mince de SAB créée par « dip-coating process » d'une solution avec une concentration protéique de 0.05 g/L avec les différents substrats nanocomposites.

Présence d'une couche mince de BSA adsorbée et déshydratée ($c = 0.05$ g/L) :

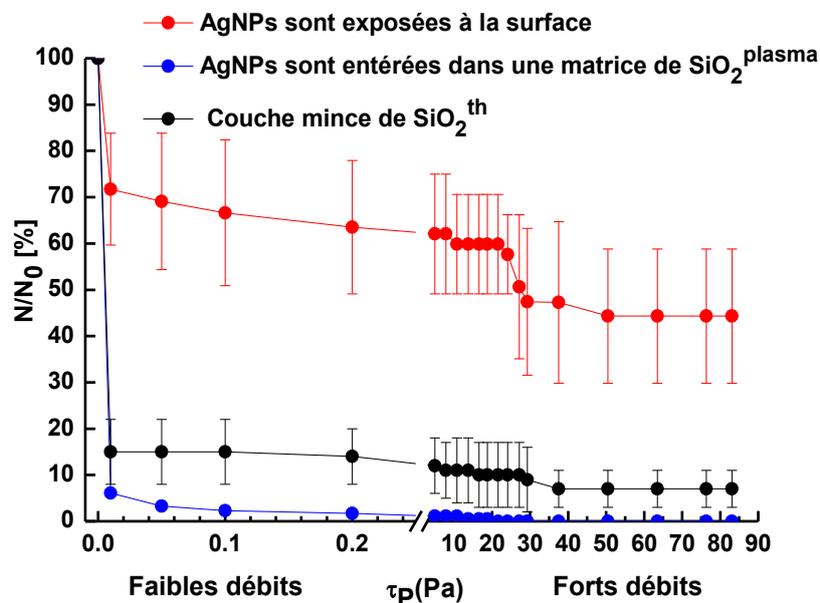


Figure V-5. Influence de la présence d'une couche mince de SAB adsorbée et déshydratée sur les différents nanocomposites sur le profil de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne \pm écart-type ; $n = 3$).

En présence de SAB adsorbée et déshydratée, on observe une diminution significative des forces d'adhésion des levures sur l'ensemble des substrats nanocomposites. L'adhésion des levures est plus importante lorsque les AgNPs sont exposées à la surface (71 %) qu'avec la couche mince de SiO₂th (15 %) ou la matrice de SiO₂^{plasma} dans laquelle les AgNPs sont enterrées (6 %). Avec la couche mince de SiO₂th ou la matrice de SiO₂^{plasma}, on obtient un profil de détachement cellulaire similaire avec une adhésion minimale des levures. Ce rôle positif des AgNPs exposées associées à une couche de SAB est également maintenu (44 % de cellules adhérees) sous l'application de fortes contraintes de cisaillement pariétales (>37.50 Pa). Le détachement total des levures est observé lorsque les AgNPs sont enterrées dans la matrice de SiO₂^{plasma} dans ces mêmes conditions. Avec la couche mince de SiO₂th, l'adhésion des levures est maintenue, mais avec un très faible pourcentage (7 %) de levures adhérees dans ces mêmes conditions.

Les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher 2 %, 50 % et 90 % des levures initialement adhérees en présence de SAB adsorbée et déshydratée à la surface des différents nanocomposites sont présentées dans le tableau V-3.

Présence d'une couche mince de SAB	N ₀ (Cellules /cm ²)	t _{p 2 %} (Pa)	t _{p 50 %} (Pa)	t _{p 90 %} (Pa)
SiO ₂ th + SAB	6.5*10 ⁴ ± 0.4*10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.70*10 ⁻²	19
SiO ₂ th + SAB+ AgNPs exposées	6.0*10 ⁴ ± 0.2*10 ⁴	0.63*10 ⁻³	28	N/A
SiO ₂ th + AgNPs enterrées+ SAB	6.3*10 ⁴ ± 0.5*10 ⁴	0.20*10 ⁻³	0.50*10 ⁻²	1*10 ⁻²

Tableau V-3. Nombre de levures initialement adhérees (N₀) en présence de protéines de SAB adsorbées et déshydratées sur les différents substrats nanocomposites (moyenne ± écart-type ; n = 3); contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % (t_{p 2 %} (Pa)), 50 % (t_{p 50 %} (Pa)) et 90 % (t_{p 90 %} (Pa)) des levures initialement adhérees.

D'après le tableau V-3, une contrainte de cisaillement plus importante est nécessaire pour détacher 50 % et 90 % des levures adhérees en présence de la SAB et des AgNPs exposées comparé à la couche mince de SiO₂th seule ou à la matrice de SiO₂^{plasma} dans ces mêmes conditions. En effet, en présence des AgNPs exposées à la surface et de la SAB, la contrainte de cisaillement nécessaire pour le détachement de 50 % des levures adhérees est 4000 fois supérieure à celle observée avec la SiO₂th seule ou avec la matrice de SiO₂^{plasma}. De plus, avec les AgNPs exposées à la surface, la contrainte nécessaire pour détacher 90 % des levures n'est

pas atteinte durant l'expérimentation. Les contraintes nécessaires pour détacher 2 % et 50 % sont similaires pour la SiO_2^{th} et la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ en présence de la SAB adsorbée et déshydratée. Le détachement de 90 % des levures adhérees est atteint plus facilement avec la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ qu'avec la SiO_2^{th} (19 Pa vs 0.01 Pa, respectivement) dans ces mêmes conditions.

Cette différence d'adhésion observable avec les AgNPs est probablement due aux forces électrostatiques élevées présentes lorsque les AgNPs sont exposées à la surface et identifiées précédemment également en absence de SAB (Fig. V-2). Ces résultats suggèrent que la couche mince de SAB présente avec les AgNPs exposées à la surface n'est pas suffisante pour permettre une inhibition significative de l'adhésion des levures. Par conséquent, l'adhésion cellulaire est maintenue par des forces électrostatiques fortes même en présence des molécules de SAB. La couche de SAB obtenue à la concentration d'essai (0.05 g/L) apparaît organisée en « dentelle » et est donc caractérisée par la présence de zones libres, sans protéines ou les AgNPs restent donc directement exposées aux levures. Lorsque les AgNPs sont enterrées dans la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$, une inhibition significative de l'adhésion microbienne est observée, corrélée à la présence de la couche mince de SAB présente sur l'échantillon. Pour ce type de support, le fait que les AgNPs soient enterrées dans la matrice diélectrique de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$, même à faible distance de la surface, suffit pour empêcher la mise en place de fortes interactions électrostatiques liées aux AgNPs et les profils de détachement obtenus sont alors proches de ceux observés avec la SiO_2^{th} seule. La présence des AgNPs sous forme enterrée se traduit bien par une perte de viabilité, sans modification de l'adhésion initiale.

3.2 Adhésion de *C. albicans* en présence de Fn adsorbée et déshydratée à la surface des nanocomposites

La figure V-6 présente les différents profils de détachement de *C. albicans* obtenus en présence de Fn adsorbée et déshydratée à la surface des différents nanocomposites. Les profils de détachement sont relativement similaires, quel que soit le substrat nanocomposite utilisé. Une augmentation significative de l'adhésion cellulaire est observée pour les trois échantillons testés par rapport au résultat obtenu en absence de Fn (Fig. V-2) : 79 % de levures adhérees lorsque les AgNPs sont enterrées dans la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ contre 13 % en absence de Fn, sous l'application de la première contrainte de cisaillement (0.01 Pa).

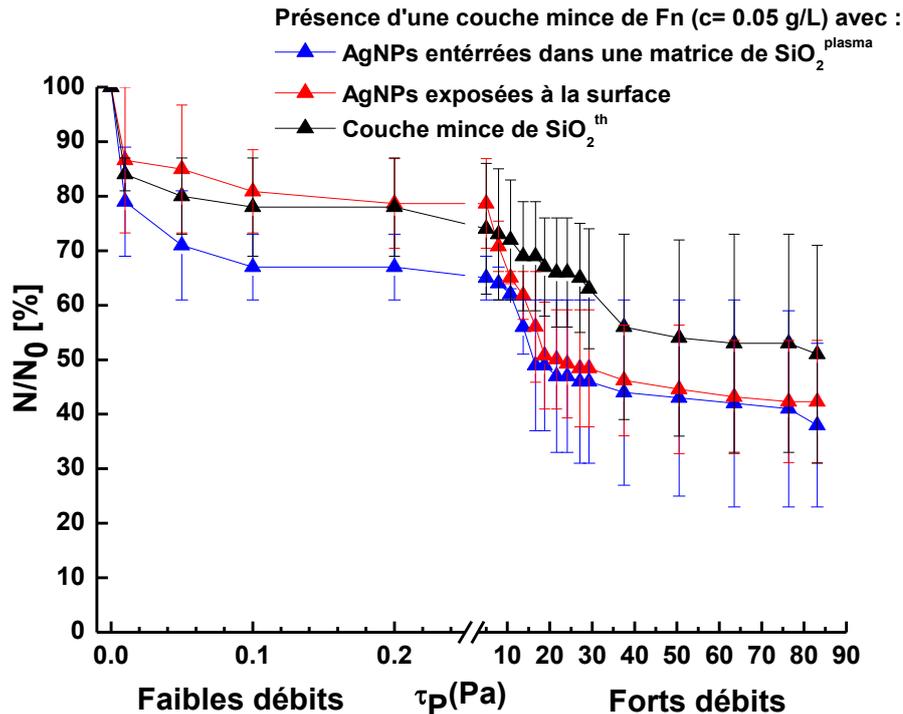


Figure V-6 : Influence de la présence d'une couche mince de Fn adsorbée et déshydratée sur les différents nanocomposites sur les profils de détachement de *C. albicans* dans des conditions hydrodynamiques contrôlées (moyenne \pm écart-type ; n = 3).

Ces valeurs sont de 84 % avec la couche mince de SiO₂th contre 28 % pour le même support en absence de la Fn. En présence des AgNPs exposées, le pourcentage de levures adhérees est de 87 %, mais pour ce type de support en absence de Fn un pourcentage de levures adhérees élevé est également observé (76 %). L'adhésion des levures est ensuite maintenue pour les trois échantillons sous l'application des faibles contraintes de cisaillement pariétal, ainsi que pour de fortes contraintes. À la fin de l'expérimentation, plus de 38 % des levures restent adhérees en présence de Fn pour les trois types d'échantillons ; la valeur la plus élevée étant observée avec la SiO₂th.

Les contraintes de cisaillement nécessaires pour détacher 2 %, 50 % et 90 % des levures initialement adhérees en présence de Fn adsorbée et déshydratée à la surface des différents nanocomposites sont présentées dans le tableau V-4. La contrainte de cisaillement pariétale nécessaire pour détacher 50 % des cellules n'a pas été atteinte avec la couche mince de SiO₂th en présence de Fn. En revanche, avec les échantillons où les AgNPs sont exposées à la surface ou enterrées dans une matrice de SiO₂^{plasma}, la contrainte de cisaillement nécessaire pour détacher 50 % des levures est comprise entre 21 et 22 Pa. Il n'a pas été possible d'atteindre la contrainte nécessaire au détachement de 90 % des levures pour les trois échantillons.

Présence d'une couche mince de Fn	N_0 (Cellules /cm ²)	$t_{p\ 2\ \%}$ (Pa)	$t_{p\ 50\ \%}$ (Pa)	$t_{p\ 90\ \%}$ (Pa)
SiO ₂ th + Fn	$6.5 \cdot 10^4 \pm 0.3 \cdot 10^4$	$0.46 \cdot 10^{-3}$	N/A	N/A
SiO ₂ th + AgNPs exposées + Fn	$6.0 \cdot 10^4 \pm 0.1 \cdot 10^4$	$0.62 \cdot 10^{-3}$	22	N/A
SiO ₂ th + AgNPs enterrées + Fn	$6.1 \cdot 10^4 \pm *10^4$	$0.37 \cdot 10^{-3}$	21.2	N/A

Tableau V-4. Nombre de levures initialement adhérentes (N_0) en présence de Fn adsorbée et déshydratée sur les différents substrats nanocomposites (moyenne \pm écart-type ; $n = 3$. Contraintes de cisaillement pariétales nécessaires pour détacher 2 % ($t_{p\ 2\ \%}$ (Pa)), 50 % ($t_{p\ 50\ \%}$ (Pa)) et 90 % ($t_{p\ 90\ \%}$ (Pa)) des levures initialement adhérentes.

Les résultats obtenus montrent bien une augmentation des forces d'adhésion des levures en présence de Fn adsorbée et déshydratée sur les différents nanocomposites. Cette adhésion est ensuite maintenue durant toute l'expérimentation et cela même sous l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétal. Cependant, avec la présence des AgNPs exposées en surface, on observe une diminution plus importante de l'adhésion cellulaire lors de l'application des faibles contraintes de cisaillement. Il est également possible de noter qu'une contrainte de cisaillement pariétale de 21-22 Pa conduit au détachement de 50 % des levures en présence des AgNPs (enterrées ou exposées). Ces résultats suggèrent que les AgNPs pourraient interagir avec les molécules de Fn adsorbées et déshydratées. Les AgNPs peuvent interagir directement avec la Fn lorsqu'elles sont exposées à la surface, mais également par le biais des Ag⁺ relargués lorsqu'elles sont enterrées à une très faible profondeur (5.5 nm) dans la matrice de SiO₂^{plasma}. Les AgNPs faciliteraient donc directement ou par le biais des Ag⁺ le détachement des levures sous l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétal. Les analyses MEB effectuées dans le Chapitre IV ont montré que les molécules de Fn pouvaient englober totalement un groupe d'AgNPs. Ce phénomène pourrait conduire à une diminution des interactions électrostatiques liées aux AgNPs exposées. Le rôle des Ag⁺ dans la diminution de l'adhésion cellulaire observée reste à définir.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, l'influence de la présence des protéines SAB ou Fn adsorbées et déshydratées à la surface de différents substrats nanocomposites sur l'adhésion de *C. albicans* a été évaluée. Les substrats nanocomposites étudiés sont composés d'une couche mince de SiO₂th, d'une monocouche d'AgNPs exposées à la surface de la couche mince de SiO₂th ou encore d'AgNPs enterrées dans une matrice de SiO₂^{plasma} à une profondeur contrôlée de 5.5 nm. En absence des protéines, la comparaison des différents substrats nanocomposites a révélé une amplification de l'adhésion des levures en présence des AgNPs exposées à la surface. Comparée à la couche mince de SiO₂th ou à la matrice de SiO₂^{plasma} dans laquelle des AgNPs ont été enterrées, l'adhésion cellulaire en présence des AgNPs exposées a été maintenue même sous l'application des contraintes maximales. Les résultats suggèrent ainsi l'impact positif des AgNPs sur les forces d'adhésion de la levure *C. albicans*. Cependant, les analyses de viabilité cellulaire ont montré que la presque totalité des levures était non viable après la phase initiale d'adhésion à la monocouche d'AgNPs (1h30 en condition statique). Ce même résultat a également été obtenu lorsque les AgNPs étaient enterrées dans la matrice de SiO₂^{plasma} en raison d'un relargage progressif des Ag⁺ via la couche de silice. Cependant, dans ce cas, les interactions électrostatiques dues aux AgNPs mises en jeu pour l'adhésion des levures n'interviennent pas.

Les résultats ont révélé des différences significatives en fonction de la nature de la protéine utilisée. En effet, une augmentation de l'adhésion cellulaire a été observée avec la Fn adsorbée et déshydratée sur les différents substrats nanocomposites. L'adhésion des levures est alors maintenue même sous l'application des fortes contraintes de cisaillement pariétal. En revanche, en présence de SAB adsorbée et déshydratée, une diminution de l'adhésion cellulaire est observée. Dans ces mêmes conditions, nous avons pu confirmer le rôle positif des AgNPs exposées à la surface sur l'adhésion de *C. albicans*. Cette amplification de l'adhésion en présence des AgNPs exposées est due aux forces électrostatiques élevées mises en jeu par les AgNPs tensioactives. De plus la couche de SAB à la concentration d'essai de 0.05 g/L s'organise en un réseau de type « dentelle » avec de nombreux espaces libres conduisant à une interaction directe avec la SiO₂th ou les AgNPs exposées. Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent donc clairement l'importance à la fois des caractéristiques physico-chimiques des surfaces (AgNPs exposées) et de la présence d'un film de conditionnement constitué de protéines sur l'adhésion de la levure *C. albicans*.

Conclusion générale et perspectives

L'adsorption protéique sur la surface d'un matériau est un problème important dans les secteurs industriels et plus particulièrement dans le domaine biomédical et l'industrie alimentaire. La conformation et la disposition des protéines adsorbées peuvent influencer les différentes étapes de l'adhésion microbienne sur la surface. *In fine*, l'adhésion microbienne peut conduire à la formation d'un biofilm qui dégradera l'état sanitaire de la surface. Dans ce contexte, la connaissance des mécanismes d'adsorption des protéines sur les surfaces est donc d'une importance primordiale dans les domaines évoqués ci-dessus. Nous avons proposé dans ce travail d'élucider le rôle des protéines adsorbées sur la surface des matériaux dans l'adhésion microbienne et d'altérer cette adhésion par des revêtements nanocomposites à base d'AgNPs. Notre premier objectif a été d'apporter des informations supplémentaires pour comprendre les mécanismes l'adsorption de protéines sur des surfaces solides, leur organisation et conformation en utilisant des couches minces de silice et des matériaux nanocomposites à base d'AgNPs enterrées dans une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ à une distance contrôlée de quelques nanomètres de la surface. Ce système couplé protéines/AgNPs nous a permis de mettre en évidence l'influence des AgNPs, mais également de protéines adsorbées et déshydratées sur l'adhésion de la levure *C. albicans*.

Pour répondre au premier objectif, nous avons utilisé une large gamme de techniques analytiques de pointe et d'outils permettant de sonder de différente manière l'adsorption protéique. Nous avons utilisé la spectroscopie Raman exaltée de surface pour décrire les différentes conformations des molécules de DsRed adsorbées et déshydratées sur la surface des substrats plasmoniques. Les substrats plasmoniques étaient composés d'une monocouche d'AgNPs enterrées à quelques nanomètres de la surface dans une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$. L'architecture particulière de la couche nanocomposite combinée à la présence des AgNPs a permis d'obtenir l'effet d'exaltation de surface recherché de manière très efficace. *In fine*, la détection des signatures moléculaires de la DsRed adsorbée à proximité des AgNPs a été possible. La DsRed a été sélectionnée du fait de ses propriétés intrinsèques de fluorescence. En effet, sa bande d'absorption se superpose parfaitement avec la résonance plasmonique des substrats plasmoniques utilisés. Ce recouvrement des bandes a permis d'obtenir une amélioration supplémentaire, par le biais de l'effet SERS résonant, des conditions nécessaires afin de détecter les signatures moléculaires de la DsRed. Suite à l'étude par spectroscopie

Raman exaltée de surface, la détection de trois différentes conformations de la DsRed a été possible dans la gamme spectrale située entre 1000-1800 cm^{-1} . Lors de l'interaction avec le faisceau optique, les mesures ont révélé que la structure du chromophore de la DsRed subissait des transformations optiques et chimiques assistées conduisant à des transitions réversibles entre les trois conformations différentes. Les résultats ont permis d'obtenir des informations supplémentaires sur l'environnement chimique du chromophore. Dans la région spectrale de 200-1000 cm^{-1} , des informations sur la structure secondaire des protéines de DsRed ont été détectées. Dans la gamme spectrale située entre 2800-3500 cm^{-1} , nous avons également détecté des informations sur la structure primaire et secondaire de la DsRed. Les résultats ont suggéré que la structure secondaire de la DsRed était majoritairement préservée, même si certains changements conformationnels du chromophore peuvent s'opérer. Ces résultats révèlent également le caractère dynamique de l'interaction entre les protéines, le faisceau laser et les surfaces plasmoniques. Dans un second temps, nous avons également sélectionné des protéines de SAB et de Fn présentées dans la littérature comme pouvant influencer l'adhésion microbienne et la formation du biofilm microbien. L'interaction des différentes protéines avec des substrats nanocomposites a également été évaluée. Nous avons donc utilisé différents modèles de substrats nanocomposites avec des architectures bien définies et modulables à base de SiO_2 et d'AgNPs. L'intérêt de l'utilisation de la SiO_2 réside dans le fait que c'est un matériau qui rentre dans la composition de céramiques qui suscitent de plus en plus d'intérêt dans le domaine biomédical (conception de revêtements antibactériens d'implants orthopédiques et dentaires...). Les AgNPs ont été également utilisés à cause de leurs propriétés antimicrobiennes. Les substrats nanocomposites à base de SiO_2 et d'AgNPs ont été réalisés à l'aide d'un procédé de dépôt par plasma. Nous avons donc dans un premier temps utilisé une couche mince de SiO_2^{th} , une monocouche d'AgNPs exposées à la surface d'une couche mince de SiO_2^{th} , ou encore une matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ dans laquelle des AgNPs sont enterrées à quelques nanomètres de la surface. L'organisation des protéines adsorbées et déshydratées à la surface des différents nanocomposites a été étudiée en utilisant notamment des gouttelettes protéiques ou des couches minces protéiques. Les gouttelettes protéiques ont été déposées à la surface des différents échantillons et leurs déshydratations ont été suivies au cours du temps. Les mesures des angles de contact des gouttelettes possédant différentes concentrations protéiques ont montré une interaction hydrophile avec la surface de SiO_2^{th} . Cependant, en augmentant la concentration protéique des gouttelettes, l'angle de contact mesuré augmentait également. En ce qui concerne les mesures effectuées avec des gouttelettes de DsRed à différents pH, les résultats suggèrent la stabilité des protéines DsRed sous des pH acides et basiques. Avec des gouttelettes de

suspension de *C. albicans*, c'est un comportement différent qui a été observé avec des mesures des angles de contact significativement moins élevées qu'avec les gouttelettes protéiques. Avec l'utilisation des différents substrats nanocomposites, les mesures des angles de contact des gouttelettes protéiques déposées ont montré une interaction hydrophobe. Les différents dépôts protéiques déshydratés ont été analysés en utilisant notamment la microscopie optique, électronique, l'ellipsométrie et la spectroscopie FTIR. L'évolution de l'épaisseur des différentes couches protéiques obtenue en faisant varier la concentration des solutions protéiques a permis de mettre en évidence la formation dynamique des couches minces protéiques sur la SiO₂th. Le contrôle précis de l'épaisseur des couches protéiques formées était également possible en ajustant la concentration des différentes solutions protéiques utilisées. Les mesures des angles de contact de l'EPPI ont également été réalisées sur des couches minces protéiques et ont montré des valeurs qui augmentaient avec l'augmentation de l'épaisseur des couches protéiques adsorbées et déshydratées.

Pour la gamme de concentrations utilisée l'analyse par spectroscopie ellipsométrique a démontré que pour la plus faible concentration (0.01 g.L⁻¹) les BSA s'organisent en monocouche non continue et non dense progressivement évoluant vers une monocouche plus compacte et plus complexe avec l'augmentation des concentrations protéiques. La DsRed ne conserve pas sa structure tétramérique en contact avec une surface solide. Seuls de monocouches non continus constitués principalement de monomères et de quelques résidus tétramériques ont été obtenus avec l'ensemble des concentrations étudiées. Les analyses AFM PF-QNM nous ont permis également de confirmer les épaisseurs extraites des mesures ellipsométriques. Les différences morphologiques observées entre les couches minces protéiques peuvent être dues à la taille largement inférieure de la DsRed comparée à la SAB. Les images obtenues par AFM ont révélé une organisation protéique sous la forme d'un réseau de type « dentelle » avec la SAB, de structures sous forme de « tiges » avec la DsRed et des structures ramifiées avec la Fn. Les bandes Amide I et II détectées pour les deux couches minces protéiques (SAB et Fn) sont caractéristiques de la structure secondaire des protéines et dans le cas de la DsRed de la structure secondaire et de son chromophore. Cependant, une analyse plus complète du déplacement des différentes fréquences de vibrations détectées permettrait de confirmer la conservation de la structure secondaire des différentes protéines.

Pour répondre au deuxième objectif et connaître l'influence des AgNPs ou de la SAB et de la Fn sur l'adhésion des levures, nous avons utilisé une chambre à écoulement cisailé avec l'application d'une gamme de contraintes de cisaillement pariétales. L'effet des AgNPs sur

l'adhésion de *C. albicans* est très distinct en fonction de type d'interaction des AgNPs sur les levures : qu'elles soient exposées à la surface (contact direct) ou enterrées dans une couche de silice (via le relargage des Ag^+). En absence des protéines, la comparaison des différentes courbes de détachement obtenues avec les différents substrats nanocomposites a révélé un impact positif des AgNPs exposées à la surface sur l'adhésion des levures. En présence des AgNPs exposées à la surface, l'adhésion de *C. albicans* a été maintenue même sous l'application des contraintes maximales. La couverture des AgNPs par une couche de silice conduit à un impact anti-adhésif dû à la surface apolaire de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$ de la même manière que pour une couche seule de SiO_2^{th} . Le détachement total des levures adhérees sur la matrice était possible. Nous nous sommes ensuite intéressés à la viabilité des levures adhérees sur les différents substrats nanocomposites. Les analyses de viabilité cellulaire ont montré que la majorité des levures adhérees étaient non viables après le contact direct avec la monocouche d'AgNPs exposées. La majorité des levures étaient également non viables lorsque les AgNPs étaient enterrées dans la matrice de $\text{SiO}_2^{\text{plasma}}$. Ces résultats suggèrent la capacité des levures à rester adhérees à la monocouche d'AgNPs malgré des dommages structurels de leurs parois directement par les AgNPs ou progressivement par les Ag^+ . Concernant les protéines, les résultats ont révélé des différences significatives en fonction de la nature des protéines utilisées. En effet, une augmentation de l'adhésion des levures a été observée avec la Fn adsorbée et déshydratée à la surface des différents substrats nanocomposites. En présence de Fn, l'adhésion des levures a également été maintenue même sous l'application de la contrainte de cisaillement maximale. En revanche, en présence de SAB adsorbée et déshydratée, c'est une diminution de l'adhésion des levures qui a été observée. Cependant, en présence des AgNPs exposées dans ces mêmes conditions, l'adhésion des levures était significativement élevée malgré une légère diminution liée à la présence de SAB. L'augmentation du pourcentage de levures adhérees en présence des AgNPs exposées est sûrement due à la présence de forces électrostatiques engendrées par ces AgNPs. L'organisation en réseau de type dentelle de la SAB à la concentration testée, n'a pas permis d'inhiber totalement l'effet positif des AgNPs sur l'adhésion cellulaire.

L'ensemble des résultats acquis durant cette thèse montre bien comment la présence des protéines adsorbées et déshydratées peut influencer les propriétés physico-chimiques des surfaces solides sur lesquelles elles ont adhéré. La concentration, la nature de la protéine, la solution dans laquelle se trouvent les protéines, mais également la constitution de la surface solide sont autant de paramètres à prendre en compte lors de la conception de matériaux destinés

au domaine biomédical et l'industrie agroalimentaire. Ces différents paramètres définissent *in fine*, la morphologie et la structure de la couche protéique adsorbée sur une surface solide. Ce film conditionnant pourra ensuite influencer l'adhésion microbienne et par la suite le développement du biofilm sur la surface.

Les résultats obtenus constituent une approche des différents éléments en jeu lors de la phase d'adhésion protéique, puis d'adhésion microbienne. Le design de matériaux limitant ces premières étapes impliquées dans l'encrassement des surfaces nous conduit à envisager différentes perspectives.

Ainsi, nous pouvons envisager d'étudier l'adsorption protéique dans des conditions se rapprochant au plus des « conditions réelles », en utilisant des **combinaisons de protéines**, voire des fluides physiologiques issus du corps humain. Les études Raman pourraient être réalisées en prenant en compte ce type de mélange.

L'évaluation des profils de détachement cellulaire en utilisant différentes formes de *C. albicans* serait également un plus dans la compréhension des phénomènes impliqués dans l'adhésion et la **formation du biofilm** de cette levure. La possibilité d'utilisation de fluides physiologiques dans lesquels les levures seraient préconditionnées serait également une approche d'intérêt pour de se rapprocher des « conditions réelles » d'adhésion cellulaire. L'évaluation de l'ensemble de ces paramètres sur le développement du biofilm de *C. albicans* permettrait également d'apporter des informations supplémentaires pour la compréhension de ce mode de constitution et d'existence des levures. Un de nos objectifs principaux est donc de transposer l'utilisation de la cellule à écoulement à l'étude de la formation du biofilm à *C. albicans*, dans les différentes conditions étudiées dans ce travail (silice seule, conditionnée par des protéines, avec AgNPs,...) (Skerl *et al.*, 1984; Chandra *et al.*, 2001; Sheppard *et al.*, 2004; Nett *et al.*, 2016; Willaert, 2018).

Ainsi, il serait également intéressant de mener une étude approfondie de l'impact des **AgNPs et des Ag⁺** dans des conditions réelles sur la formation et le développement du biofilm de *C. albicans* (Despax *et al.*, 2011; Pugliara, 2016). Cet objectif comporte une étude approfondie sur les mécanismes de libération des Ag⁺ et de leur diffusion à travers la couche mince de SiO₂^{plasma} et du film conditionnant pourrait être menée après l'immersion des différents substrats nanocomposites dans des fluides biologiques. Ces expériences peuvent impliquer des analyses FTIR, XPS, et EDX. L'influence de la porosité de la matrice de

couverture des AgNPs sur la libération des Ag⁺ permettrait également d'explorer le changement progressif de la composition cette couche de couverture. L'autre aspect à explorer concerne le suivi de l'impact des AgNPs et des Ag⁺ au niveau cellulaire, par utilisation de nos nanocomposites.

En fonction de l'ensemble des résultats recueillis, le design d'une matrice optimale prenant en compte divers paramètres (taux d'adsorption, porosité, densité et taille des AgNPs, relargage des Ag⁺) pourrait alors émerger. Ce genre d'étude multidisciplinaire sur l'ingénierie rationnelle de matériaux nanocomposites multifonctionnels s'inscrit ainsi dans une démarche de type "safe-by-design". En effet, l'ingénierie rationnelle de matériaux nanocomposites et la compréhension de leur comportement dans des conditions réelles d'application permettraient *in fine*, la conception de nanocomposites multifonctionnels et optimisés, répondant aux problématiques d'une utilisation sûre dans le domaine de la santé et dans d'autres applications.

Bibliographie

A Latour, R. (2008) Biomaterials: Protein–Surface Interactions. *Encycl Biomater Biomed Eng* **1**.

A. Utracki, L. (1993) PLASMA DEPOSITION, TREATMENT, AND ETCHING OF POLYMERS edited by R. d’Agostino Academic Press, Inc., Boston 528 pages, hard cover, 1990. *Materials and Manufacturing Processes - MATER MANUF PROCESS* **8**: 385–390.

Abu-Lail, N.I., and Camesano, T.A. (2003) Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of Escherichia coli JM109. *Environ Sci Technol* **37**: 2173–2183.

Ahmad Khalili, A., and Ahmad, M.R. (2015) A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci* **16**: 18149–18184.

Akpan, A. (2002) Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal* **78**: 455–459.

All About Albumin (1995) Elsevier, .
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125521109X50004>. Accessed September 10, 2019.

Almeida, R.S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J.E., *et al.* (2008) The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. *PLoS Pathogens* **4**: e1000217.

Alt, E., Leipold, F., Milatovic, D., Lehmann, G., Heinz, S., and Schömig, A. (1999) Hydrogen peroxide for prevention of bacterial growth on polymer biomaterials. *Ann Thorac Surg* **68**: 2123–2128.

An, Y.H., and Friedman, R.J. (1998) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**: 338–348.

ANSES (2014) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail.
<https://www.anses.fr/fr/content/%C3%A9valuation-des-risques-li%C3%A9s-aux-nanomat%C3%A9riaux>. Accessed October 12, 2019.

- Antley, P.P., and Hazen, K.C. (1988) Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. *Infect Immun* **56**: 2884–2890.
- Arnold, J.W., and Bailey, G.W. (2000) Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci* **79**: 1839–1845.
- Aumaille, K., Vallée, C., Granier, A., Gouillet, A., Gaboriau, F., and Turban, G. (2000) A comparative study of oxygen/organosilicon plasmas and thin SiO_xCyHz films deposited in a helicon reactor. *Thin Solid Films* **359**: 188–196.
- Baalousha, M., Arkill, K.P., Romer, I., Palmer, R.E., and Lead, J.R. (2015) Transformations of citrate and Tween coated silver nanoparticles reacted with Na₂S. *Science of The Total Environment* **502**: 344–353.
- Baillie, G.S. (2000) Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 397–403.
- Baillie, G.S., and Douglas, L.J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* **48**: 671–679.
- Baillif, S., Casoli, E., Marion, K., Roques, C., Pellon, G., Hartmann, D.J., *et al.* (2006) A Novel In Vitro Model to Study Staphylococcal Biofilm Formation on Intraocular Lenses under Hydrodynamic Conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 3410–3416.
- Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., and Kodjikian, L. (2010) Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d’Ophtalmologie* **33**: 210–221.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11984–11989.
- Barillo, D.J., and Marx, D.E. (2014) Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns* **40**: S3–S8.

- Barnes, L.-M., Lo, M.F., Adams, M.R., and Chamberlain, A.H.L. (1999) Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4543–4548.
- Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**: 1073–1101.
- Baujard-Lamotte, L., Noinville, S., Goubard, F., Marque, P., and Pauthe, E. (2008) Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* **63**: 129–137.
- Bell, A.F., He, X., Wachter, R.M., and Tonge, P.J. (2000) Probing the Ground State Structure of the Green Fluorescent Protein Chromophore Using Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **39**: 4423–4431.
- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.-M., and Henry, N. (2008) A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS Biol* **6**: e167.
- Benavidez, T.E., Torrente, D., Marucho, M., and Garcia, C.D. (2015) Adsorption of Soft and Hard Proteins onto OTCEs under the influence of an External Electric Field. *Langmuir* **31**: 2455–2462.
- Bendel, C.M., and Hostetter, M.K. (1993) Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides. *Journal of Clinical Investigation* **92**: 1840–1849.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K., and Zehnder, A.J.B. (1993) Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3973–3977.
- Benítez, F., Martínez, E., and Esteve, J. (2000) Improvement of hardness in plasma polymerized hexamethyldisiloxane coatings by silica-like surface modification. *Thin Solid Films* **377–378**: 109–114.
- Benzo, P., Bonafos, C., Bayle, M., Carles, R., Cattaneo, L., Farcau, C., *et al.* (2013) Controlled synthesis of buried delta-layers of Ag nanocrystals for near-field plasmonic effects on free surfaces. *Journal of Applied Physics* **113**: 193505.

Benzo, P., Cattaneo, L., Farcau, C., Andreozzi, A., Perego, M., Benassayag, G., *et al.* (2011) Stability of Ag nanocrystals synthesized by ultra-low energy ion implantation in SiO₂ matrices. *Journal of Applied Physics* **109**: 103524.

Bergmann, E. (2014) Dépôts sous vide par procédés plasma - Principes. *Ref: TIP553WEB - "Traitements des métaux"* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/traitements-de-surface-des-metaux-par-voie-seche-et-en-milieu-fondu-42360210/depots-sous-vide-par-procedes-plasma-m1663/>. Accessed July 8, 2019.

Borella, M. (2006) Contrôle de la fonctionnalisation de surface de revêtements obtenus par PECVD à partir d'un composé organosilicié cyclique (Fichier d'ordinateur, 2006) [WorldCat.org]. <https://www.worldcat.org/title/controle-de-la-fonctionnalisation-de-surface-de-revetements-obtenus-par-pecvd-a-partir-dun-compose-organosilicie-cyclique/oclc/494128878>. Accessed October 6, 2019.

Bos, O.J., Labro, J.F., Fischer, M.J., Wilting, J., and Janssen, L.H. (1989) The molecular mechanism of the neutral-to-base transition of human serum albumin. Acid/base titration and proton nuclear magnetic resonance studies on a large peptic and a large tryptic fragment of albumin. *J Biol Chem* **264**: 953–959.

Bos, R., Mei, H.C. van der, and Busscher, H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 179–230.

Boura, C., Muller, S., Vautier, D., Dumas, D., Schaaf, P., Claude Voegel, J., *et al.* (2005) Endothelial cell—interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **26**: 4568–4575.

Boutaleb, N. (2007) *Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable*. Lorient, . <http://www.theses.fr/2007LORIS099>. Accessed February 20, 2018.

Bromuro, C., Torosantucci, A., Gomez, M.J., Urbani, F., and Cassone, A. (1994) Differential release of an immunodominant 65 kDa mannoprotein antigen from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Medical Mycology* **32**: 447–459.

Brugnoni, L.I., Lozano, J.E., and Cubitto, M.A. (2007) Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International* **40**: 332–340.

Bruinsma, G.M., Mei, H.C. van der, and Busscher, H.J. (2001) Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* **22**: 3217–3224.

Bruzaud, J., Guilbaud, M., Chevalier, S., Maillot, E., Guillot, A., Monnet, V., *et al.* (2014) Bacterial surface sensing: Phenotype of adherent bacteria depends on abiotic surface properties. <https://hal-agroparistech.archives-ouvertes.fr/hal-01570138>. Accessed February 23, 2018.

Bryers, J.D. (1987) Biologically Active Surfaces: Processes Governing the Formation and Persistence of Biofilms. *Biotechnology Progress* **3**: 57–68.

Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* **9**: 327–335.

Calderón-Jiménez, B., Johnson, M.E., Montoro Bustos, A.R., Murphy, K.E., Winchester, M.R., and Vega Baudrit, J.R. (2017) Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Front Chem* **5** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2017.00006/full>. Accessed June 21, 2019.

Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., and Roques, C. (2002) Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1469–1474.

Campbell, J.H., and Terranova, V.P. (1988) Laminin: molecular organization and biological function. *J Oral Pathol* **17**: 309–323.

Cannon, R.D., Holmes, A.R., Mason, A.B., and Monk, B.C. (1995) Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *Journal of Dental Research* **74**: 1152–1161.

Carles, R., Farcau, C., Bonafos, C., Benassayag, G., Bayle, M., Benzo, P., *et al.* (2011) Three dimensional design of silver nanoparticle assemblies embedded in dielectrics for Raman spectroscopy enhancement and dark-field imaging. *ACS Nano* **5**: 8774–8782.

- Carles, R., Farcău, C., Bonafos, C., Benassayag, G., Pécassou, B., and Zwick, A. (2009) The synthesis of single layers of Ag nanocrystals by ultra-low-energy ion implantation for large-scale plasmonic structures. *Nanotechnology* **20**: 355305.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* **75**: 499–511.
- Carter, D.C., and Ho, J.X. (1994) Structure of Serum Albumin. In *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, pp. 153–203
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323308606403>. Accessed September 25, 2019.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., and Jarrell, K.F. (2006) Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 73–116.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., and Ghannoum, M.A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* **183**: 5385–5394.
- Channavajjala, L.S., Eidsath, A., and Saxinger, W.C. (1997) A simple method for measurement of cell-substrate attachment forces: application to HIV-1 Tat. *Journal of Cell Science* **110**: 249–256.
- Characklis, W.G., and Cooksey, K.E. (1983) Biofilms and Microbial Fouling. In *Advances in Applied Microbiology*. Laskin, A.I. (ed.). Academic Press, pp. 93–138
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408703551>. Accessed February 20, 2018.
- Characklis, W.G., McFeters, G.A., and Marshall, K.C. (eds) (1990) Physiological ecology in biofilm systems. In *Characklis WG, Marshall KC, eds*. John Wiley & Sons, New York.
- Chen, G., and Strevett, K.A. (2001) Impact of surface thermodynamics on bacterial transport. *Environ Microbiol* **3**: 237–245.
- Chen, T. (2014) Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie - thesesups. <http://thesesups.ups-tlse.fr/2172/>. Accessed October 6, 2019.

- Chen, X., and Chen, Z. (2006) SFG studies on interactions between antimicrobial peptides and supported lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**: 1257–1273.
- Cheng, Y., Feng, G., and Moraru, C.I. (2019) Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review. *Front Microbiol* **10**
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00191/full>. Accessed September 24, 2019.
- Cheung, L.S.-L., Zheng, X., Wang, L., Guzman, R., Schroeder, J.A., Heimark, R.L., *et al.* (2010) Kinematics of Specifically Captured Circulating Tumor Cells in Bio-Functionalized Microchannels. *Journal of Microelectromechanical Systems* **19**: 752–763.
- Christ, K.V., and Turner, K.T. (2010) Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates. *Journal of Adhesion Science and Technology* **24**: 2027–2058.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* **90**: 1103–1163.
- Cogan, N.G., and Keener, J.P. (2004) The role of the biofilm matrix in structural development. *Math Med Biol* **21**: 147–166.
- Colman, B.P., Arnaout, C.L., Anciaux, S., Gunsch, C.K., Jr, M.F.H., Kim, B., *et al.* (2013) Low Concentrations of Silver Nanoparticles in Biosolids Cause Adverse Ecosystem Responses under Realistic Field Scenario. *PLOS ONE* **8**: e57189.
- Coronado, E.A., and Schatz, G.C. (2003) Surface plasmon broadening for arbitrary shape nanoparticles: A geometrical probability approach. *J Chem Phys* **119**: 3926–3934.
- Cramton, S.E., and Götz, F. (2004) Biofilm Development in Staphylococcus. *Microbial Biofilms* 64–84.
- Cuéllar-Cruz, M., Vega-González, A., Mendoza-Novelo, B., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Quintanar-Escorza, M.A., and Villagómez-Castro, J.C. (2012) The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**: 2513–2527.

Dahiya, R.S., and Speck, M.L. (1968) Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* **51**: 1568–1572.

Dakal, T.C., Kumar, A., Majumdar, R.S., and Yadav, V. (2016) Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5110546/>. Accessed September 23, 2019.

Dale, A.L., Lowry, G.V., and Casman, E.A. (2013) Modeling Nanosilver Transformations in Freshwater Sediments. *Environ Sci Technol* **47**: 12920–12928.

Daniluk, T., Tokajuk, G., Stokowska, W., Fiedoruk, K., Sciepek, M., Zaremba, M.L., *et al.* (2006) Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci* **51 Suppl 1**: 77–80.

Dankert, J. (1986) Biomedical polymers : bacterial adhesion, colonization, and indentification. *Crit Rev Biocompat* **2**: 219–301.

De Bernardis, F., Liu, H., O’Mahony, R., La Valle, R., Bartollino, S., Sandini, S., *et al.* (2007) Human Domain Antibodies against Virulence Traits of *Candida albicans* Inhibit Fungus Adherence to Vaginal Epithelium and Protect against Experimental Vaginal Candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* **195**: 149–157.

Despax, B., and Flouttard, J.L. (1989) Synthesis of gold-carbon composites by simultaneous sputtering and plasma polymerization of propane in r.f. capacitively coupled diode system (13.56 MHz). *Thin Solid Films* **168**: 81–88.

Despax, B., and Raynaud, P. (2007) Deposition of “Polysiloxane” Thin Films Containing Silver Particles by an RF Asymmetrical Discharge. *Plasma Processes Polym* **4**: 127–134.

Despax, B., Saulou, C., Raynaud, P., Datas, L., and Mercier-Bonin, M. (2011) Transmission electron microscopy for elucidating the impact of silver-based treatments (ionic silver versus nanosilver-containing coating) on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nanotechnology* **22**: 175101.

Dilonardo, E., Milella, A., Palumbo, F., Capitani, G., Agostino, R. d’, and Fracassi, F. (2010) One-Step Plasma Deposition of Platinum Containing Nanocomposite Coatings. *Plasma Processes and Polymers* **7**: 51–58.

- DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., and Lauffenburger, D.A. (1993) Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *The Journal of Cell Biology* **122**: 729–737.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis* **8**: 881–890.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167–193.
- Douglas, L.J. (2003) Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* **11**: 30–36.
- Drábik, M., Pešička, J., Biederman, H., and Hegemann, D. (2015) Long-term aging of Ag/a-C:H:O nanocomposite coatings in air and in aqueous environment. *Sci Technol Adv Mater* **16** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5036476/>. Accessed September 23, 2019.
- Dumas, C. (2007) Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000617/>. Accessed February 23, 2018.
- Egger, S., Lehmann, R.P., Height, M.J., Loessner, M.J., and Schuppler, M. (2009) Antimicrobial Properties of a Novel Silver-Silica Nanocomposite Material. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2973–2976.
- Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet, D. (2003) Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases* **3**: 685–702.
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., and Tolaymat, T.M. (2011) Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environ Sci Technol* **45**: 283–287.
- El Khatib, M., Martins, A., Bourgeois, D., Colletier, J.-P., and Adam, V. (2016) Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm. *Scientific Reports* **6** <http://www.nature.com/articles/srep18459>. Accessed October 4, 2019.
- El-Azizi, M.A., Starks, S.E., and Khardori, N. (2004) Interactions of Candida albicans with other Candida spp. and bacteria in the biofilms*. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 1067–1073.

- Fadeeva, E., Truong, V.K., Stiesch, M., Chichkov, B.N., Crawford, R.J., Wang, J., and Ivanova, E.P. (2011) Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation. *Langmuir* **27**: 3012–3019.
- Feijter, J.A.D., Benjamins, J., and Veer, F.A. (1978) Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* **17**: 1759–1772.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., and Kim, J.O. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**: 662–668.
- Field, S.F., Bulina, M.Y., Kelmanson, I.V., Bielawski, J.P., and Matz, M.V. (2006) Adaptive evolution of multicolored fluorescent proteins in reef-building corals. *J Mol Evol* **62**: 332–339.
- Finkel, J.S., and Mitchell, A.P. (2011) Genetic control of Candida albicans biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **9**: 109–118.
- Fleischmann, M., Hendra, P.J., and McQuillan, A.J. (1974) Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**: 163–166.
- Fletcher, M. (1976) The Effects of Proteins on Bacterial Attachment to Polystyrene. *Microbiology* **94**: 400–404.
- Fletcher, M. (1988) Effects of electrolytes on attachment of aquatic bacteria to solid surfaces. *Estuaries* **11**: 226–230.
- Foldbjerg, R., and Autrup, H. (2013) Mechanisms of silver nanoparticle toxicity. *Arch Basic Appl Med* **1**: 5–15.
- Fox, C.L., and Modak, S.M. (1974) Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **5**: 582–588.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W.A., Belanger, P.H., Edwards, J.E., and Filler, S.G. (1998) Expression of the Candida albicans gene ALS1 in Saccharomyces cerevisiae induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**: 1783–1786.

Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J., and Hostetter, M.K. (1998) Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, INT1. *Science* **279**: 1355–1358.

Gallant, N.D., Michael, K.E., and García, A.J. (2005) Cell Adhesion Strengthening: Contributions of Adhesive Area, Integrin Binding, and Focal Adhesion Assembly. *MBoC* **16**: 4329–4340.

Ganguly, S., and Mitchell, A.P. (2011) Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 380–385.

García, A.J., Ducheyne, P., and Boettiger, D. (1997) Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. *Biomaterials* **18**: 1091–1098.

García, A.J., Ducheyne, P., and Boettiger, D. (1998) Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* **40**: 48–56.

García, J.R.V., and Goto, T. (2003) Thermal barrier coatings produced by chemical vapor deposition. *Science and Technology of Advanced Materials* **4**: 397–402.

Gaur, N.K. (2004) Accessibility of the peptide backbone of protein ligands is a key specificity determinant in *Candida albicans* SRS adherence. *Microbiology* **150**: 277–284.

Geisow, M.J., and Beaven, G.H. (1977) Physical and binding properties of large fragments of human serum albumin. *Biochem J* **163**: 477–484.

Gelamo, E.L., Silva, C.H.T.P., Imasato, H., and Tabak, M. (2002) Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochim Biophys Acta* **1594**: 84–99.

Gelder, J.D., Gussem, K.D., Vandenabeele, P., and Moens, L. (2007) Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy* **38**: 1133–1147.

Gervais, T., El-Ali, J., Günther, A., and Jensen, K.F. (2006) Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab on a Chip* **6**: 500.

- Ghigo, J.-M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442–445.
- Ghigo, J.-M. (2003) Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in Microbiology* **154**: 1–8.
- Gottenbos, B., Grijpma, D.W., Mei, H.C. van der, Feijen, J., and Busscher, H.J. (2001) Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* **48**: 7–13.
- Goujon, M., Belmonte, T., and Henrion, G. (2004) OES and FTIR diagnostics of HMDSO/O₂ gas mixtures for SiO_x deposition assisted by RF plasma. *Surface and Coatings Technology* **188–189**: 756–761.
- Grivet, M., Morrier, J.J., Benay, G., and Barsotti, O. (2000) Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med* **11**: 637–642.
- Gu, Y., and Li, D. (2000) The ζ -Potential of Glass Surface in Contact with Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **226**: 328–339.
- Guillemot, G., Lorthois, S., Schmitz, P., and Mercier-Bonin, M. (2007) Evaluating the Adhesion Force Between *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Cells and Polystyrene From Shear-Flow Induced Detachment Experiments. *Chemical Engineering Research and Design* **85**: 800–807.
- Guillemot, G., Vaca-Medina, G., Martin-Yken, H., Vernhet, A., Schmitz, P., and Mercier-Bonin, M. (2006) Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **49**: 126–135.
- Ha, S.-W., Weitzmann, M.N., and Beck, G.R. (2013) Dental and Skeletal Applications of Silica-Based Nanomaterials. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. Elsevier, pp. 69–91 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781455731275000040>. Accessed September 30, 2019.

- Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Bengourram, J., Kouider, N., Elghmari, A., and Habbari, K. (2011) Evaluation of the relative cell surface charge by using microbial adhesion to hydrocarbon. *Microbiology* **80**: 488–491.
- Harden, V.P., and Harris, J.O. (1953) THE ISOELECTRIC POINT OF BACTERIAL CELLS1. *J Bacteriol* **65**: 198–202.
- Harrington, W.F., Johnson, P., and Ottewill, R.H. (1956) Bovine serum albumin and its behaviour in acid solution. *Biochem J* **62**: 569–582.
- Hawser, S.P., and Douglas, L.J. (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* **62**: 915–921.
- Hazan, I., Sepulveda-Becerra, M., and Liu, H. (2002) Hyphal Elongation Is Regulated Independently of Cell Cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **13**: 134–145.
- Hazen, K.C. (1989) Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun* **57**: 1894–1900.
- He, X., Bell, A.F., and Tonge, P.J. (2002) Synthesis and Spectroscopic Studies of Model Red Fluorescent Protein Chromophores. *Org Lett* **4**: 1523–1526.
- Hegemann, D., Vohrer, U., Oehr, C., and Riedel, R. (1999) Deposition of SiO_x films from O₂/HMDSO plasmas. *Surface and Coatings Technology* **116–119**: 1033–1036.
- Hegg, P.-O., Castberg, H.B., and Lundh, G. (1985) Fouling of whey proteins on stainless steel at different temperatures. *Journal of Dairy Research* **52**: 213.
- Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Schumacher-Perdreau, F., *et al.* (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 693–701.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., and Fukuhara, K. (1990) Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **173**: 639–646.
- Hogan, D.A. (2006) Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi: FIG. 1. *Eukaryotic Cell* **5**: 613–619.

- Hogt, A.H., Dankert, J., and Feijen, J. (1985) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol* **131**: 2485–2491.
- Hogt, A.H., Dankert, J., Vries, J.A. de, and Feijen, J. (1983) Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J Gen Microbiol* **129**: 2959–2968.
- Holt, K.B., and Bard, A.J. (2005) Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺. *Biochemistry* **44**: 13214–13223.
- Hood, S.K., and Zottola, E.A. (1997) Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Cells to Stainless Steel. *Journal of Food Protection* **60**: 1034–1037.
- Horbett, T.A., and Brash, J.L. (1987) Proteins at Interfaces: Current Issues and Future Prospects. In *Proteins at Interfaces*. American Chemical Society, pp. 1–33 <https://doi.org/10.1021/bk-1987-0343.ch001>. Accessed September 2, 2019.
- Hoyer, L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* **9**: 176–180.
- Hu, H., and Larson, R.G. (2005) Analysis of the Effects of Marangoni Stresses on the Microflow in an Evaporating Sessile Droplet. *Langmuir* **21**: 3972–3980.
- Husmark, U., and Rönner, U. (1990) Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J Appl Bacteriol* **69**: 557–562.
- Irene, E.A. (1985) Silicon Oxidation. In *Integrated Circuits: Chemical and Physical Processing*. American Chemical Society, pp. 31–46 <https://doi.org/10.1021/bk-1985-0290.ch003>. Accessed September 4, 2019.
- Iuliano, D.J., Saavedra, S.S., and Truskey, G.A. (1993) Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research* **27**: 1103–1113.
- Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., and Meiller, T.F. (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 14–19.

Jenney, C.R., and Anderson, J.M. (2000) Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J Biomed Mater Res* **49**: 435–447.

Jones, C.R., Adams, M.R., Zhdan, P.A., and Chamberlain, A.H.L. (1999) The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 917–927.

Jucker, B.A., Harms, H., and Zehnder, A.J. (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol* **178**: 5472–5479.

Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., and Siegrist, H. (2011) Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environ Sci Technol* **45**: 3902–3908.

Kallay, N., Kovačević, D., Dedić, I., and Tomašić, V. (1994) Effect of Corrosion on the Isoelectric Point of Stainless Steel. *CORROSION* **50**: 598–602.

Kalo, A., Segal, E., Sahar, E., and Dayan, D. (1988) Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. *J Infect Dis* **157**: 1253–1256.

Kapur, R., and Rudolph, A.S. (1998) Cellular and Cytoskeleton Morphology and Strength of Adhesion of Cells on Self-Assembled Monolayers of Organosilanes. *Experimental Cell Research* **244**: 275–285.

Katsikogianni, M., and Missirlis, Y.F. (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* **8**: 37–57.

Kay, E., and Hecq, M. (1984) Metal clusters in plasma polymerized matrices: Gold. *Journal of Applied Physics* **55**: 370–374.

Khan, M.Y. (1986) Direct evidence for the involvement of domain III in the N-F transition of bovine serum albumin. *Biochem J* **236**: 307–310.

Khang, G., Lee, S.J., Lee, Y.M., Lee, J.H., and Lee, H. bang (2000) the Effect of Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Adhesiveness to Modified Polyurethane Surfaces. *Korea Polym J* **8**: 179–185.

- Kierans, M., Staines, A.M., Bennett, H., and Gadd, G.M. (1991) Silver tolerance and accumulation in yeasts. *Biol Metals* **4**: 100–106.
- King, R.D., Lee, J.C., and Morris, A.L. (1980) Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* **27**: 667–674.
- Kirk, C.T. (1988) Quantitative analysis of the effect of disorder-induced mode coupling on infrared absorption in silica. *Phys Rev B* **38**: 1255–1273.
- Klasen, H.J. (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**: 131–138.
- Klotz, S.A., and Smith, R.L. (1991) A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J Infect Dis* **163**: 604–610.
- Körner, E., Aguirre, M.H., Fortunato, G., Ritter, A., Rühle, J., and Hegemann, D. (2010) Formation and Distribution of Silver Nanoparticles in a Functional Plasma Polymer Matrix and Related Ag⁺ Release Properties. *Plasma Processes and Polymers* **7**: 619–625.
- Körner, E., Fortunato, G., and Hegemann, D. (2009) Influence of RF Plasma Reactor Setup on Carboxylated Hydrocarbon Coatings. *Plasma Processes and Polymers* **6**: 119–125.
- Kozai, T.D.Y., Langhals, N.B., Patel, P.R., Deng, X., Zhang, H., Smith, K.L., *et al.* (2012) Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nature Materials* **11**: 1065–1073.
- Kreibig, U., and Vollmer, M. (1995) *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://www.springer.com/gp/book/9783540578369>. Accessed September 2, 2019.
- Krekeler, C., Ziehr, H., and Klein, J. (1989) Physical methods for characterization of microbial surfaces. *Experientia* **45**: 1047–1055.
- Kuchma, S.L., and O'Toole, G.A. (2000) Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 429–433.

- Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., *et al.* (2008) Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C* **112**: 5825–5834.
- Kylián, O., Choukourov, A., and Biederman, H. (2013) Nanostructured plasma polymers. *Thin Solid Films* **548**: 1–17.
- K. Young, E.W., R. Wheeler, A., and A. Simmons, C. (2007) Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells in microfluidic channels. *Lab on a Chip* **7**: 1759–1766.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**: 105–132.
- Lacy, W.B., Williams, J.M., Wenzler, L.A., Beebe, T.P., and Harris, J.M. (1996b) Characterization of SiO₂-Overcoated Silver-Island Films as Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal Chem* **68**: 1003–1011.
- Lampert, M.A. (1964) Volume-controlled current injection in insulators. *Rep Prog Phys* **27**: 329–367.
- Lansdown, A. b. g. (2002) Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* **11**: 125–130.
- Larsericdotter, H., Oscarsson, S., and Buijs, J. (2005) Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *Journal of Colloid and Interface Science* **289**: 26–35.
- Lartundo-Rojas, L. (2007) Influence de l'adsorption de protéine (BSA) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17Cr en solution aqueuse. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00004963>. Accessed September 25, 2019.
- Laurent, C., and Kay, E. (1989) Properties of metal clusters in polymerized hydrocarbon versus fluorocarbon matrices. *Journal of Applied Physics* **65**: 1717–1723.
- Le Ouay, B., and Stellacci, F. (2015) Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* **10**: 339–354.
- Le Ru, E.C., and Etchegoin, P.G. (2012) Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* **63**: 65–87.

Leclercq-Perlat, M.-N., and Lalande, M. (1994) Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *Journal of Food Engineering* **23**: 501–517.

Lee, J.H., Lee, S.J., Khang, G., and Lee, H.B. (2000) The Effect of Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Adhesiveness to Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *Journal of Colloid and Interface Science* **230**: 84–90.

Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G.V., and Brown, G.E. (2012) Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ Sci Technol* **46**: 6900–6914.

Levard, C., Mitra, S., Yang, T., Jew, A.D., Badireddy, A.R., Lowry, G.V., and Brown, G.E. (2013) Effect of Chloride on the Dissolution Rate of Silver Nanoparticles and Toxicity to *E. coli*. *Environ Sci Technol* **47**: 5738–5745.

Levard, C., Reinsch, B.C., Michel, F.M., Oumahi, C., Lowry, G.V., and Brown, G.E. (2011) Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate. *Environ Sci Technol* **45**: 5260–5266.

Li, D., Lu, X., Lin, H., Ren, F., and Leng, Y. (2013) Chitosan/bovine serum albumin co-micropatterns on functionalized titanium surfaces and their effects on osteoblasts. *J Mater Sci Mater Med* **24**: 489–502.

Liang, M.N., Smith, S.P., Metallo, S.J., Choi, I.S., Prentiss, M., and Whitesides, G.M. (2000) Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13092–13096.

Liau, S.Y., Read, D.C., Pugh, W.J., Furr, J.R., and Russell, A.D. (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 279–283.

Lide, D., and Haynes, W. (2009) CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data. /editor-in-chief David R. Lide, associate editor HPR Frederikse ed1997, Boca Raton, Fla: CRC .

Lieberman, M.A., and Lichtenberg, A.J. (2005) *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing*. John Wiley & Sons, .

Liu, J., Pennell, K.G., and Hurt, R.H. (2011) Kinetics and Mechanisms of Nanosilver Oxysulfidation. *Environ Sci Technol* **45**: 7345–7353.

Liu, X., Zhou, X., Li, S., Lai, R., Zhou, Z., Zhang, Y., and Zhou, L. (2014) Effects of titania nanotubes with or without bovine serum albumin loaded on human gingival fibroblasts. *Int J Nanomedicine* **9**: 1185–1198.

Liu, Y., Strauss, J., and Camesano, T.A. (2008) Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials* **29**: 4374–4382.

Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., *et al.* (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* **12**: 527–534.

Loosdrecht, M.C. van, Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A.J. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1893–1897.

Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte, S.C., and Lead, J.R. (2012) Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol* **46**: 6893–6899.

Lu, H., Koo, L.Y., Wang, W.M., Lauffenburger, D.A., Griffith, L.G., and Jensen, K.F. (2004) Microfluidic Shear Devices for Quantitative Analysis of Cell Adhesion. *Anal Chem* **76**: 5257–5264.

Luey, J.-K., McGuire, J., and Sproull, R.D. (1991) The effect of pH and NaCl concentration on adsorption of β -lactoglobulin at hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **143**: 489–500.

Lukaszewicz, K. (2011) Review of Nanocomposite Thin Films and Coatings Deposited by PVD and CVD Technology. *Nanomaterials* <https://www.intechopen.com/books/nanomaterials/review-of-nanocomposite-thin-films-and-coatings-deposited-by-pvd-and-cvd-technology>. Accessed July 5, 2019.

Makasheva, K., Villeneuve-Faure, C., Bonafos, C., Laurent, C., Pugliara, A., Despax, B., *et al.* (2016) Dielectric Engineering of Nanostructured Layers to Control the Transport of Injected Charges in Thin Dielectrics. *IEEE Transactions on Nanotechnology* **15**: 839–848.

- Makasheva, K., Villeneuve-Faure, C., Roy, S.L., Despax, B., Boudou, L., Laurent, C., and Teyssedre, G. (2013) Silver nanoparticles embedded in dielectric matrix: Charge transport analysis with application to control of space charge formation. In *2013 Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*. pp. 238–241.
- Marchant, J.S., Stutzmann, G.E., Leissring, M.A., LaFerla, F.M., and Parker, I. (2001) Multiphoton-evoked color change of DsRed as an optical highlighter for cellular and subcellular labeling. *Nat Biotechnol* **19**: 645–649.
- Marx, D.E., and Barillo, D.J. (2014) Silver in medicine: The basic science. *Burns* **40**: S9–S18.
- Marzbanrad, E., Rivers, G., Peng, P., Zhao, B., and Y. Zhou, N. (2015) How morphology and surface crystal texture affect thermal stability of a metallic nanoparticle: the case of silver nanobelts and pentagonal silver nanowires. *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**: 315–324.
- Mathé, C., Devineau, S., Aude, J.-C., Lagniel, G., Chédin, S., Legros, V., *et al.* (2013) Structural Determinants for Protein adsorption/non-adsorption to Silica Surface. *PLoS One* **8** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3839912/>. Accessed March 27, 2018.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**: 969–973.
- Mavor, A., Thewes, S., and Hube, B. (2005) Systemic Fungal Infections Caused by Candida Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. *Current Drug Targets* **6**: 863–874.
- McEldowney, S., and Fletcher, M. (1988) Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. *Microb Ecol* **16**: 183–195.
- McGUIRE, J., and Swartzel, K.R. (1989) The influence of solid surface energetics on macromolecular adsorption from milk. *Journal of Food Processing and Preservation* **13**: 145–160.
- Meadows, P.S. (1971) The attachment of bacteria to solid surfaces. *Archiv für Mikrobiologie* **75**: 374–381.

- Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P., and Lorthois, S. (2004) Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science* **271**: 342–350.
- Mezni, A., Dammak, T., Fkiri, A., Mlayah, A., Abid, Y., and Smiri, L.S. (2014) Photochemistry at the Surface of Gold Nanoprisms from Surface-Enhanced Raman Scattering Blinking. *J Phys Chem C* **118**: 17956–17967.
- Miller, T., and Boettiger, D. (2003) Control of Intracellular Signaling by Modulation of Fibronectin Conformation at the Cell–Materials Interface. *Langmuir* **19**: 1723–1729.
- Modrzewska, B., and Kurnatowski, P. (2015) Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol* **61**: 3–9.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., and Yacaman, M.J. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**: 2346.
- MOSHER, D. (1980) Fibronectin. *Prog Hemost Thromb* **5**: 111–151.
- Mosher, D.F., and Proctor, R.A. (1980) Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* **209**: 927–929.
- Mukherjee, P.K., Zhou, G., Munyon, R., and Ghannoum, M.A. (2005) *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology* **43**: 191–208.
- Müller, R., Eidt, A., Hiller, K.-A., Katzur, V., Subat, M., Schweikl, H., *et al.* (2009) Influences of protein films on antibacterial or bacteria-repellent surface coatings in a model system using silicon wafers. *Biomaterials* **30**: 4921–4929.
- Nailis, H., Vandenbroucke, R., Tilleman, K., Deforce, D., Nelis, H., and Coenye, T. (2009) Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia* **167**: 9–17.
- Nanophotonic FDTD Simulation Software - Lumerical FDTD *Lumerical*
<https://www.lumerical.com/products/fdtd/>. Accessed September 2, 2019.

- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., *et al.* (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**: 372–386.
- Navarro, E., Wagner, B., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2015) Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* **49**: 8041–8047.
- Nègre, E., Vogel, T., Levanon, A., Guy, R., Walsh, T.J., and Roberts, D.D. (1994) The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J Biol Chem* **269**: 22039–22045.
- Nett, J.E., Cabezas-Olcoz, J., Marchillo, K., Mosher, D.F., and Andes, D.R. (2016) Targeting Fibronectin To Disrupt In Vivo *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 3152–3155.
- Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Ross, K.M., and Andes, D.R. (2011) Interface of *Candida albicans* Biofilm Matrix-Associated Drug Resistance and Cell Wall Integrity Regulation. *Eukaryotic Cell* **10**: 1660–1669.
- Neumann, A.W., and Good, R.J. (1979) Techniques of Measuring Contact Angles. In *Surface and Colloid Science*. Good, R.J., and Stromberg, R.R. (eds). Springer US, pp. 31–91 http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-7969-4_2. Accessed July 22, 2015.
- Newman, S.L., Bhugra, B., Holly, A., and Morris, R.E. (2005) Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. *Infect Immun* **73**: 770–777.
- Ng, K.-M., Li, W.-K., Wo, S.-K., Tsang, C.-W., and Ma, N.-L. (2004) Silver(i) affinities of amides : a combined ab initio and experimental study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**: 144–153.
- Nilsson, S., Hjertberg, T., and Smedberg, A. (2010) Structural effects on thermal properties and morphology in XLPE. *European Polymer Journal* **46**: 1759–1769.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009) Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 407–450.

- Norde, W. (2008) My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **61**: 1–9.
- Norde, W., and Anusiem, A.C.I. (1992) Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids and Surfaces* **66**: 73–80.
- Norde, W., and Giacomelli, C.E. (2000) BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J Biotechnol* **79**: 259–268.
- Nuzzo, R.G., and Allara, D.L. (1983) Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J Am Chem Soc* **105**: 4481–4483.
- Nuzzo, R.G., Dubois, L.H., and Allara, D.L. (1990) Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J Am Chem Soc* **112**: 558–569.
- Ofek, I., and Beachey, E.H. (1980) General Concepts and Principles of Bacterial Adherence in Animals and Man. In *Bacterial Adherence*. Beachey, E.H. (ed.). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 1–29 https://doi.org/10.1007/978-94-009-5863-0_1. Accessed September 24, 2019.
- Oss, C.J. van, and Naim, J.O. (1996) Aspecific Immunoglobulin Binding to Hydrophobic Surfaces. In *Immunology of Silicones*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 85–91 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-85226-8_9. Accessed February 21, 2018.
- Ostuni, E., G. Chapman, R., N. Liang, M., Meluleni, G., Pier, G., E. Ingber, D., and M. Whitesides, G. (2001) Self-Assembled Monolayers That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacterial and Mammalian Cells. *Langmuir* **17**.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49–79.
- Ouaissi, M.A., and Capron, A. (1985) Fibronectines: Structures et fonctions. *Annales de l’Institut Pasteur / Immunologie* **136**: 169–185.
- Pal, S., Tak, Y.K., and Song, J.M. (2007) Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1712–1720.

- Palmer, J., Flint, S., and Brooks, J. (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 577–588.
- Parhi, P., Golas, A., and Vogler, E.A. (2010) Role of Proteins and Water in the Initial Attachment of Mammalian Cells to Biomedical Surfaces: A Review. *Journal of Adhesion Science and Technology* **24**: 853–888.
- Parsek, M.R., and Singh, P.K. (2003) Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* **57**: 677–701.
- Paulitsch, A.H., Willinger, B., Zsalatz, B., Stabentheiner, E., Marth, E., and Buzina, W. (2009) *In-vivo* Candida biofilms in scanning electron microscopy. *Medical Mycology* **47**: 690–696.
- Pauthe, E., Pelta, J., Patel, S., Lairez, D., and Goubard, F. (2002) Temperature-induced beta-aggregation of fibronectin in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* **1597**: 12–21.
- Pellicane, G., and Cavero, M. (2013) Theoretical study of interactions of BSA protein in a NaCl aqueous solution. *J Chem Phys* **138**: 115103.
- Peretyazhko, T.S., Zhang, Q., and Colvin, V.L. (2014) Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. *Environ Sci Technol* **48**: 11954–11961.
- Perrin, J., Despax, B., and Kay, E. (1985) Optical properties and microstructure of gold--fluorocarbon-polymer composite films. *Phys Rev B* **32**: 719–732.
- Peters, T. (2005) *Proteins: Structure and Function*. David Whitford. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd., 2005, 542 pp., paperback, \$65.00. ISBN 0-471-49894-7. *Clinical Chemistry* **51**: 2220–2221.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Ellis, D., Tullio, V., *et al.* (2010) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Candida Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *J Clin Microbiol* **48**: 1366–1377.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., *et al.* (2007) Als3 Is a Candida albicans Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. *PLoS Biology* **5**: e64.

Pierard, C., Quatresooz, P., Paquet, P., Henry, F., and Pierard, G. (2004) Comment je traite... la colonisation bactérienne critique d'un ulcère de jambe. Le Yin et le Yang des pansements argentiques. *Revue Médicale de Liège* **59** <https://orbi.uliege.be/handle/2268/11122>. Accessed December 4, 2018.

Pierre, G. (2010) Biochemical characterization of algal exopolymers from Marennes-Oléron and study of the physico-chemical surface properties of microorganisms involved in their adhesion. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00618169>. Accessed July 11, 2019.

Piette, J.P., and Idziak, E.S. (1992) A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2783–2791.

Podbielski, A., and Kreikemeyer, B. (2004) Cell density – dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International Journal of Infectious Diseases* **8**: 81–95.

POINTU, A.-M., PERRIN, J., and JOLLY, J. (1997) Plasmas froids de décharge - Applications et diagnostic. *Ref: TIP301WEB - "Conversion de l'énergie électrique"* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/energies-th4/materiaux-conducteurs-et-plasmas-42251210/plasmas-froids-de-decharge-d2835/>. Accessed July 8, 2019.

POINTU, A.-M., PERRIN, J., and JOLLY, J. (1998) Plasmas froids de décharge - Propriétés électriques. *Ref: TIP301WEB - "Conversion de l'énergie électrique"* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/energies-th4/materiaux-conducteurs-et-plasmas-42251210/plasmas-froids-de-decharge-d2830/>. Accessed July 5, 2019.

Pompermayer, D.M.C., and Gaylarde, C.C. (2000) The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology* **17**: 361–365.

Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W., and Busscher, H.J. (2002) Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports* **47**: 1–32.

Powers, M.J., Rodriguez, R.E., and Griffith, L.G. (1997) Cell-substratum adhesion strength as a determinant of hepatocyte aggregate morphology. *Biotechnology and Bioengineering* **53**: 415–426.

- Prasad, G.R., Daniels, S., Cameron, D.C., McNamara, B.P., Tully, E., and O’Kennedy, R. (2005) PECVD of biocompatible coatings on 316L stainless steel. *Surface and Coatings Technology* **200**: 1031–1035.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., and Lejeune, P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5993–6002.
- Pringle, J.H., and Fletcher, M. (1983) Influence of Substratum Wettability on Attachment of Freshwater Bacteria to Solid Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **45**: 811–817.
- Pringle, J.H., and Fletcher, M. (1986) Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol* **51**: 1321–1325.
- Pugliara, A. (2016) Elaboration of nanocomposites based on Ag nanoparticles embedded in dielectrics for controlled bactericide properties. <http://thesesups.ups-tlse.fr/3462/>. Accessed July 12, 2019.
- Pugliara, A., Bonafos, C., Carles, R., Despax, B., and Makasheva, K. (2015) Controlled elaboration of large-area plasmonic substrates by plasma process. *Materials Research Express* **2**: 065005.
- Pugliara, A., Makasheva, K., Despax, B., Bayle, M., Carles, R., Benzo, P., *et al.* (2016) Assessing bio-available silver released from silver nanoparticles embedded in silica layers using the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* as bio-sensors. *Science of The Total Environment* **565**: 863–871.
- Putnam, F.W. (1975) *The plasma proteins: structure, function, and genetic control*. Academic Press, .
- Qureshi, N., Annous, B.A., Ezeji, T.C., Karcher, P., and Maddox, I.S. (2005) Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories* **4**: 24.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., and Lopez-Ribot, J. (2009) Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* **35**: 340–355.

Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., and López-Ribot, J.L. (2005) Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell* **4**: 633–638.

Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2002) Inhibition of Candida albicans Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5459–5463.

Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., and Lemons, J.E. (2004) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, .

Renshaw, K.M., Orr, D.E., and Burg, K.J.L. (2005) Design and Evaluation of a Novel Flow Chamber for Measuring Cell Adhesion to Absorbable Polymer Films. *Biotechnology Progress* **21**: 538–545.

Reyes, C.D., and García, A.J. (2003) A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **67A**: 328–333.

Rochemonteix, A. de C. de (2009) *Les biofilms et la peau*. .

Rönner, U., Husmark, U., and Henriksson, A. (1990) Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol* **69**: 550–556.

Rubio, C., Costa, D., Bellon-Fontaine, M.N., Relkin, P., Pradier, C.M., and Marcus, P. (2002) Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the Pseudomonas fragi K1 adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **24**: 193–205.

Rycenga, M., Copley, C.M., Zeng, J., Li, W., Moran, C.H., Zhang, Q., *et al.* (2011) Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem Rev* **111**: 3669–3712.

Sakiyama, T., Tomura, J., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2004) Adsorption characteristics of bovine serum albumin and its peptide fragments on a stainless steel surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **33**: 77–84.

Sardella, E., Favia, P., Gristina, R., Nardulli, M., and Agostino, R. d' (2006) Plasma-Aided Micro- and Nanopatterning Processes for Biomedical Applications. *Plasma Processes and Polymers* **3**: 456–469.

SATOU, N., SATOU, J., SHINTANI, H., and OKUDA, K. (1988) Adherence of Streptococci to Surface-modified Glass. *Microbiology* **134**: 1299–1305.

Saulou, C. (2009) Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. <https://www.theses.fr/142669733>. Accessed July 18, 2019.

Saulou, C., Despax, B., Raynaud, P., Zanna, S., Marcus, P., and Mercier-Bonin, M. (2009) Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion. *Applied Surface Science* **256**: S35–S39.

Saulou, C., Jamme, F., Maranges, C., Fourquaux, I., Despax, B., Raynaud, P., *et al.* (2010) Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating. *Anal Bioanal Chem* **396**: 1441–1450.

Scarangella, A., Soumbo, M., Mlayah, A., Bonafos, C., Monje, M.-C., Roques, C., *et al.* (2019) Detection of the conformational changes of Discosoma red fluorescent proteins adhered on silver nanoparticles-based nanocomposites via surface-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology* **30**: 165101.

Scarangella, A., Soumbo, M., Villeneuve-Faure, C., Mlayah, A., Bonafos, C., Monje, M.-C., *et al.* (2018) Adsorption properties of BSA and DsRed proteins deposited on thin SiO₂ layers: optically non-absorbing versus absorbing proteins. *Nanotechnology* **29**: 115101.

Schleifenbaum, F., Peter, S., and Meixner, A.J. (2010) Detecting the Same Individual Protein and Its Photoproducts via Fluorescence and Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Imaging. *The Journal of Physical Chemistry A* **114**: 143–150.

Schlöricke, E., Schmidt, H., Schulze, H.A., Beck, R., Guthoff, R., and Falkenhagen, U. (1997) [Adherence of staphylococci of different hydrophobicity. Study of various intraocular lenses]. *Ophthalmologie* **94**: 785–790.

Scott, J.F., and Porto, S.P.S. (1967) Longitudinal and Transverse Optical Lattice Vibrations in Quartz. *Phys Rev* **161**: 903–910.

Sefiane, K. (2010) On the Formation of Regular Patterns from Drying Droplets and Their Potential Use for Bio-Medical Applications. *Journal of Bionic Engineering* **7**: S82–S93.

SEMILAB 2017 Spectroscopic Ellipsometry Analyser—SEA (WinElli 3) version 1.5.50 .

Senaratne, W., Andruzzi, L., and Ober, C.K. (2005) Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. *Biomacromolecules* **6**: 2427–2448.

Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., *et al.* (2004) Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 30480–30489.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., and Azeredo, J. (2011) Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology* **19**: 241–247.

Silva-Bermudez, P., and Rodil, S.E. (2013) An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. *Surface and Coatings Technology* **233**: 147–158.

Silva-Bermudez, P., Rodil, S.E., and Muhl, S. (2011) Albumin adsorption on oxide thin films studied by spectroscopic ellipsometry. *Applied Surface Science* **258**: 1711–1718.

Silver, S., Phung, L.T., and Silver, G. (2006) Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL* **33**: 627–634.

Silverman, R.J., Nobbs, A.H., Vickerman, M.M., Barbour, M.E., and Jenkinson, H.F. (2010) Interaction of *Candida albicans* Cell Wall Als3 Protein with *Streptococcus gordonii* SspB Adhesin Promotes Development of Mixed-Species Communities. *Infection and Immunity* **78**: 4644–4652.

Sinibaldi, R., Ortore, M.G., Spinozzi, F., Souza Funari, S. de, Teixeira, J., and Mariani, P. (2008) SANS/SAXS study of the BSA solvation properties in aqueous urea solutions via a global fit approach. *Eur Biophys J* **37**: 673–681.

- Sivakumar, P.M., Iyer, G., Natesan, L., and Doble, M. (2010) 3'-Hydroxy-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials. *Applied Surface Science* **256**: 6018–6024.
- Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T., and Scheld, W.M. (1984) In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can J Microbiol* **30**: 221–227.
- Soderquist, M.E., and Walton, A.G. (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **75**: 386–397.
- Soll, D.R. (2008) *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Current Biology* **18**: R717–R720.
- Sonntag, M.D., Klingsporn, J.M., Garibay, L.K., Roberts, J.M., Dieringer, J.A., Seideman, T., *et al.* (2012) Single-Molecule Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *J Phys Chem C* **116**: 478–483.
- Sotiriou, G.A., and Pratsinis, S.E. (2010) Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles. *Environ Sci Technol* **44**: 5649–5654.
- Sotiriou, G.A., Teleki, A., Camenzind, A., Krumeich, F., Meyer, A., Panke, S., and Pratsinis, S.E. (2011) Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area. *Chemical Engineering Journal* **170**: 547–554.
- Soumbo, M., Pugliara, A., Monje, M.C., Roques, C., Despax, B., Bonafos, C., *et al.* (2016) Physico-Chemical Characterization of the Interaction of Red Fluorescent Protein #x2014;DsRed With Thin Silica Layers. *IEEE Transactions on NanoBioscience* **15**: 412–417.
- Speers, J.G.S., and Gilmour, A. (1985) The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *Journal of Applied Bacteriology* **59**: 325–332.
- Stewart, M.E., Anderton, C.R., Thompson, L.B., Maria, J., Gray, S.K., Rogers, J.A., and Nuzzo, R.G. (2008) Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem Rev* **108**: 494–521.
- Stewart, S., and Fredericks, P.M. (1999) Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **55**: 1641–1660.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187–209.
- Strevett, K.A., and Chen, G. (2003) Microbial surface thermodynamics and applications. *Res Microbiol* **154**: 329–335.
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cellular Microbiology* **4**: 461–469.
- Szabelska, M., Gospodarek, E., and Ciok-Pater, E. (2006) [Influence of incubation conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida* species fungi]. *Med Dosw Mikrobiol* **58**: 253–260.
- Tang, H., Wang, A., Liang, X., Cao, T., Salley, S.O., McAllister, J.P., and Ng, K.Y.S. (2006) Effect of surface proteins on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization on silicone. *Colloids Surf B Biointerfaces* **51**: 16–24.
- Thompson, D.S., Carlisle, P.L., and Kadosh, D. (2011) Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell* **10**: 1173–1182.
- Tortorano, A.M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C.C., Faure, O., *et al.* (2004) Epidemiology of *Candidaemia* in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**: 317–322.
- Tozzini, V., and Giannozzi, P. (2005) Vibrational Properties of DsRed Model Chromophores. *ChemPhysChem* **6**: 1786–1788.
- Tozzini, V., and Nifosi, R. (2001) Ab Initio Molecular Dynamics of the Green Fluorescent Protein (GFP) Chromophore: An Insight into the Photoinduced Dynamics of Green Fluorescent Proteins. *J Phys Chem B* **105**: 5797–5803.
- Trantum, J.R., Eagleton, Z.E., Patil, C.A., Tucker-Schwartz, J.M., Baglia, M.L., Skala, M.C., and Haselton, F.R. (2013) Cross-Sectional Tracking of Particle Motion in Evaporating Drops: Flow Fields and Interfacial Accumulation. *Langmuir* **29**: 6221–6231.
- Trofa, D., Gacser, A., and Nosanchuk, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **21**: 606–625.

- Truskey, G.A., and Pirone, J.S. (1990) The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **24**: 1333–1353.
- Upadhyay, S.N., Mishra, P.K., Pal, D.B., Srikar, S.K., and Giri, D.D. (2016) Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry* **6**: 720–726.
- Usami, S., Chen, H.-H., Zhao, Y., Chien, S., and Skalak, R. (1993) Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Annals of Biomedical Engineering* **21**: 77–83.
- Vacheethasanee, K., and Marchant, R.E. (2000) Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* **50**: 302–312.
- Vacheethasanee, K., Temenoff, J.S., Higashi, J.M., Gary, A., Anderson, J.M., Bayston, R., and Marchant, R.E. (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res* **42**: 425–432.
- Van Haecht, J.L., Bolipombo, M., and Rouxhet, P.G. (1985) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* by adhesion: treatment of the cells by Al ions. *Biotechnol Bioeng* **27**: 217–224.
- Vasile, M.J., and Smolinsky, G. (1972) Organosilicon Films Formed by an RF Plasma Polymerization Process. *J Electrochem Soc* **119**: 451–455.
- Verdier, T. (2015) Development of coatings for indoor building materials in order to fight against microbial growth inside buildings: efficiency and mechanisms. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01332618>. Accessed October 9, 2018.
- Verkhusha, V.V., and Lukyanov, K.A. (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* **22**: 289–296.
- Vermeer, A.W.P., and Norde, W. (2000) CD Spectroscopy of Proteins Adsorbed at Flat Hydrophilic Quartz and Hydrophobic Teflon Surfaces. *J Colloid Interface Sci* **225**: 394–397.
- Vernhet, A., and Bellon-Fontaine, M.N. (1995) Role of bentonites in the prevention of *Saccharomyces cerevisiae* adhesion to solid surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **3**: 255–262.

Vimbela, G.V., Ngo, S.M., Frazee, C., Yang, L., and Stout, D.A. (2017) Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine* **12**: 3941–3965.

Vo-Dinh, T. (ed.) (2005) *Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications*. Humana Press, . <https://www.springer.com/gp/book/9781588293107>. Accessed September 4, 2019.

Vogler, E.A. (2012) Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* **33**: 1201–1237.

Vrzheshch, P.V., Akovbian, N.A., Varfolomeyev, S.D., and Verkhusha, V.V. (2000) Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions. *FEBS Letters* **487**: 203–208.

Walker, S.L., Hill, J.E., Redman, J.A., and Elimelech, M. (2005) Influence of growth phase on adhesion kinetics of Escherichia coli D21g. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3093–3099.

Walker, S.L., Redman, J.A., and Elimelech, M. (2004) Role of Cell Surface Lipopolysaccharides in Escherichia coli K12 Adhesion and Transport. *Langmuir* **20**: 7736–7746.

Wang Yuling, and Irudayaraj Joseph (2013) Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**: 20120026.

Weinberger, M., Leibovici, L., Perez, S., Samra, Z., Ostfeld, I., Levi, I., *et al.* (2005) Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality. *Journal of Hospital Infection* **61**: 146–154.

Werner, C., Maitz, M.F., and Sperling, C. (2007) Current strategies towards hemocompatible coatings. *J Mater Chem* **17**: 3376–3384.

Westergren, G., and Olsson, J. (1983) Hydrophobicity and adherence of oral streptococci after repeated subculture in vitro. *Infect Immun* **40**: 432–435.

Whittaker, C.J., Klier, C.M., and Kolenbrander, P.E. (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 513–552.

- Willaert, R. (2018) Adhesins of Yeasts: Protein Structure and Interactions. *Journal of Fungi* **4**: 119.
- Williams, D.F. (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**: 2941–2953.
- Williams, T.J. (2006) Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, 3rd edition. By Joseph Goldstein, Dale Newbury, David Joy, Charles Lyman, Patrick Echlin, Eric Lifshin, Linda Sawyer, Joseph Michael Kluwer Academic Publishers, New York (2003) ISBN 0306472929; hardbac. *Scanning* **27**: 215–216.
- Williams, V., and Fletcher, M. (1996) Pseudomonas fluorescens adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 100–104.
- Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I., and Pearcy, M.J. (2005) Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* **11**: 1–18.
- Würzner, R., Langgartner, M., Spötl, L., Eder, A., Bujdáková, H., Schröppel, K., and Dierich, M.P. (1996) Temperature-dependent surface expression of the beta-2-integrin analogue of Candida albicans and its role in adhesion to the human endothelium. *Exp Clin Immunogenet* **13**: 161–172.
- Wyre, R.M., and Downes, S. (2002) The role of protein adsorption on chondrocyte adhesion to a heterocyclic methacrylate polymer system. *Biomaterials* **23**: 357–364.
- Xia, Y., and Whitesides, G.M. (1998) Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition* **37**: 550–575.
- Xiong, K., Fan, Q., Wu, T., Shi, H., Chen, L., and Yan, M. (2017) Enhanced bovine serum albumin absorption on the N-hydroxysuccinimide activated graphene oxide and its corresponding cell affinity. *Materials Science and Engineering: C* **81**: 386–392.
- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1999) Roles of Three Histidine Kinase Genes in Hyphal Development and Virulence of the Pathogenic Fungus Candida albicans. *J Bacteriol* **181**: 7243–7247.
- Yang, D.H.-C., and Pon, L.A. (2003) Toxicity of Metal Ions Used in Dental Alloys: A Study in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Drug and Chemical Toxicology* **26**: 75–85.

- Yang, W., Shen, C., Ji, Q., An, H., Wang, J., Liu, Q., and Zhang, Z. (2009) Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* **20**: 085102.
- Yang, Y., Glover, R., and Ong, J.L. (2003) Fibronectin adsorption on titanium surfaces and its effect on osteoblast precursor cell attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **30**: 291–297.
- Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V., and Remington, S.J. (2001) Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 462–467.
- Yu, L., Lee, K.K., Ens, K., Doig, P.C., Carpenter, M.R., Staddon, W., *et al.* (1994) Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin. *Infect Immun* **62**: 2834–2842.
- Zayats, A.V., and Smolyaninov, I.I. (2003) Near-field photonics: surface plasmon polaritons and localized surface plasmons. *J Opt A: Pure Appl Opt* **5**: S16–S50.
- Zhang, C., Hu, Z., and Deng, B. (2016) Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Research* **88**: 403–427.
- Zhang, X., Hicks, E.M., Zhao, J., Schatz, G.C., and Van Duyne, R.P. (2005) Electrochemical Tuning of Silver Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography. *Nano Lett* **5**: 1503–1507.
- Zhang, X., Jones, P., and Haswell, S.J. (2008) Attachment and detachment of living cells on modified microchannel surfaces in a microfluidic-based lab-on-a-chip system. *Chemical Engineering Journal* **135**: S82–S88.
- Zhao, X., Oh, S.-H., Cheng, G., Green, C.B., Nuessen, J.A., Yeater, K., *et al.* (2004) ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology (Reading, Engl)* **150**: 2415–2428.

Annexes

Annexe A : Création des couches minces protéiques à l'aide de la méthode d'enduction par trempage

Les couches minces protéiques ont été élaborées en utilisant la méthode d'enduction par trempage (dip-coating process). La figure 1 présente les différentes étapes utilisées lors de l'élaboration des différentes couches minces protéiques adsorbées et déshydratées. Premièrement, les différents substrats spécifiques (en quartz et de Si couverts par une couche fine d'environ 100 nm de SiO₂) possédant une surface 1 cm x 1 cm ont été immergés durant une heure dans 1 mL des différentes solutions protéiques (SAB, DsRed et Fn). Les solutions protéiques ont été préparées à des concentrations allant de 0.01 à 5 g/L pour la SAB, de 0.01 à 0.1 g/L pour la DsRed et de 0.01 à 1 g/L pour la Fn. Deuxièmement, les différents échantillons ont ensuite été immergés dans de l'EPPI pour enlever les protéines non adhérentes. Troisièmement, les différents échantillons ont subi une phase de déshydratation à température ambiante (23°C).

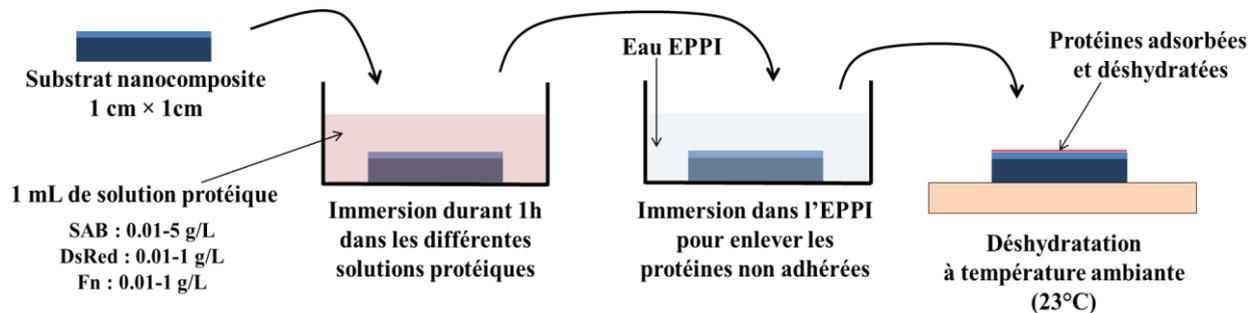


Figure 1 : Représentation schématique de la création des couches minces protéiques à l'aide de la méthode d'enduction par trempage.

Annexe B : Contrôle de la viabilité des levures présentes au début de l'expérimentation de détachement cellulaire

Dans un premier temps, nous avons souhaité connaître l'influence de l'EPPI utilisée sur l'état structurel des levures. En effet, avant que les levures n'adhèrent à la surface de l'échantillon, les levures ont été dispersées dans de l'EPPI qui est un milieu hypotonique pouvant avoir une influence sur la viabilité cellulaire. Après avoir laissé durant 1h30 les cellules de *C. albicans* dans l'EPPI, les marqueurs fluorescents (Syto9 et IP) ont été ajoutés dans la suspension et le comptage des levures c'est effectuer en microscopie confocale. Le fluorophore SYTO-9 a été utilisé, car il pénètre dans toutes les cellules (engendrant une fluorescence verte) et l'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant de l'ADN ne pénétrant que les cellules dont les membranes sont endommagées. Ce couple de marqueurs a donc été utilisé comme marqueurs de l'intégrité membranaire. La figure 1 (a) montre le pourcentage de cellules viables ou non obtenu après le comptage des levures en microscopie confocale après marquage au Syto9 et à l'IP (Dead/Live®). On observe qu'après avoir laissé les levures durant 1h30 dans l'EPPI, la majorité des levures sont viables (90 %).

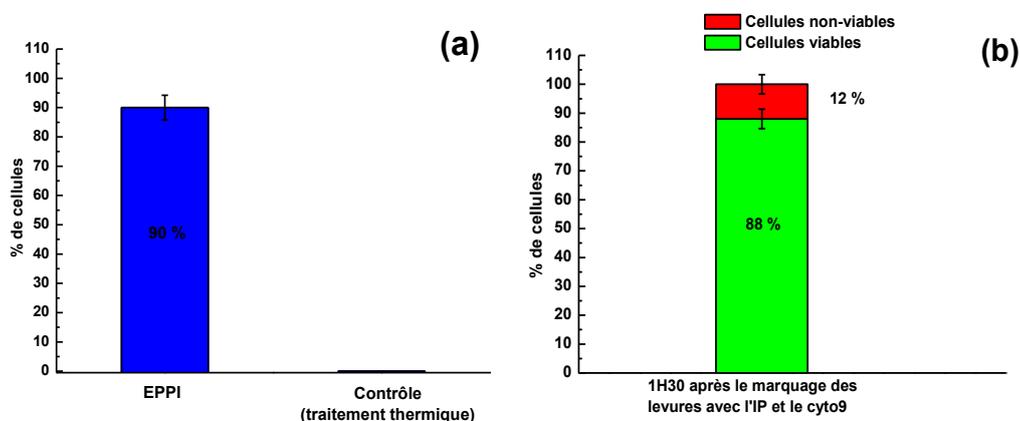


Figure C-1 : (a) Pourcentage de levures viables 1h30 après la préparation de la suspension dans l'EPPI. (b) Pourcentage de levures viables après une mise en contact durant 1H30 avec les différents marqueurs fluorescents.

Dans un second temps, nous avons souhaité connaître l'influence des marqueurs fluorescents utilisés (Syto9 et l'IP) sur l'état structurel des levures. Nous avons testé l'influence des marqueurs fluorescents utilisée sur la viabilité des levures. En effet, durant les expériences de détachement cellulaire, l'IP et le Syto9 ont été injectés au début de l'expérimentation et ils sont restés en contact avec les levures durant 1h30 dans la chambre à écoulement cisailé. La figure V-1 (b) présente le pourcentage de levures viables après un temps de contact d'1h30 avec

les différents marqueurs fluorescents. On observe que 88 % des levures sont viables et 12 % sont endommagées après la mise en contact avec les différents marqueurs fluorescents durant 1h30.

Les contrôles effectués nous confirment que l'EPPI et les marqueurs fluorescents n'affectent que très légèrement la viabilité des levures durant les 1h30 de temps de contact auxquelles elles sont soumises. La perte de la viabilité observée en présence des nanocomposites à base d'AgNPs et de silice (chapitre V) est donc bien provoquée par l'action combinée des AgNPs et/ou des Ag⁺.

Abstract

Microbial adhesion on solid surfaces is the source of multiple negative impacts in many areas. This step is considered prior to biofilm formation. It might be influenced by the presence of a conditioning layer generated after protein adsorption on the surface. Thus, strategies to act during the initial phase of microbial adhesion represent an appropriate approach to prevent biocontamination of solid surfaces. However, they require understanding of the underlying mechanisms at the molecular level. In this context, nanocomposite materials based on silver nanoparticles (AgNPs) and silica (SiO₂) appear as relevant tools. This thesis focuses on the use of nanocomposite thin layers containing a plan of AgNPs exposed on their surfaces or buried in a SiO₂^{plasma} matrix at a controlled distance of a few nanometers from the surface in order to explore, on the one hand, the adhesion of model proteins (Bovine Serum Albumin, DsRed and Fibronectin) and their conformational changes and secondly, the kinetics of detachment of the yeast *Candida albicans* under the different conditions. AgNPs are well known for their antimicrobial activities but also for their optical properties allowing detection of molecular signatures at their proximities. Following the application of surface-enhanced Raman spectroscopy using AgNP-based nanocomposite layers, the detection of three conformations of DsRed (red fluorescent protein) adsorbed and dehydrated on plasmonic substrates was achieved. The obtained results show that the conformational changes of proteins with a strong internal coherence are reversible. In parallel, we have evaluated the dynamics of the organization and behavior of BSA, Fn and DsRed in contact with thin silica layers or silica layers containing AgNPs. Contact angle measurements of droplets of different protein concentrations showed increasing hydrophilic interaction with thermal SiO₂th. For the nanocomposite layers, the surface hydrophobicity is modified. The thickness and optical properties of the adsorbed protein layers were evaluated by spectroscopic ellipsometry. Depending on the protein concentration in solution the results show the evolution of a non-continuous and non-dense protein monolayer to a more compact and complex monolayer at high concentrations. The images obtained by near-field microscopy revealed a protein organization in "lace-like" network with BSA, "rod-like" structure with DsRed and "branching" type for Fn. The spectra obtained by infrared spectroscopy show the peaks, characteristic of the secondary structure of proteins. Finally, the influence of AgNPs on the adhesion of *C. albicans* was quantified *in vitro* using a hydrodynamic method allowing the application of very low shear stresses. Marked and maintained adhesion was observed in the presence of exposed AgNPs. The interaction with AgNPs buried in a few nanometers from the surface leads to a sharp decrease in the adhesion of *C. albicans*. The presence of a thin layer of BSA or Fn on the different nanocomposites results in drastic changes, with an increase in the adhesion in the case of Fn and a decrease in the case of BSA. The work carried out demonstrates the influence of surface conditioning on their physico-chemical properties, as well as their evolution during dehydration, and their ability to be colonized by microorganisms.

Résumé

Dans de nombreux secteurs, l'adhésion microbienne sur les surfaces est la source de multiples impacts négatifs. Cette étape est considérée comme préliminaire au développement de biofilm et peut être influencée par la présence d'un film conditionnant engendré par l'adsorption des protéines sur la surface. Ainsi, les stratégies visant une intervention au moment de la phase initiale d'adhésion représentent une approche appropriée pour prévenir la bio-contamination des surfaces et nécessitent une compréhension à l'échelle moléculaire. Dans ce contexte, les matériaux nanocomposites à base de nanoparticules d'argents (AgNPs) et de silice (SiO₂) apparaissent comme des outils pertinents. Ce travail de thèse porte sur l'utilisation de substrats nanocomposites possédant une monocouche d'AgNPs exposées à leurs surfaces ou enterrées dans une matrice de SiO₂^{plasma} à une distance contrôlée de quelques nanomètres de la surface afin d'explorer, d'une part l'adhésion de protéines modèles (Sérum Albumine Bovine, DsRed et Fibronectine) et leurs changements conformationnels et d'autre part, la cinétique de détachement de la levure *Candida albicans* dans les différentes conditions. Les AgNPs sont bien connues pour leurs activités antimicrobiennes et présentent de plus, des propriétés optiques permettant de détecter des signatures moléculaires à leurs proximités. Suite à l'application de la spectroscopie Raman exaltée de surface en utilisant les couches nanocomposites à base d'AgNPs, la détection de trois conformations de la DsRed (protéine fluorescente rouge) adsorbée et déshydratée sur les substrats plasmoniques a été possible. Les résultats obtenus montrent que les changements conformationnels des protéines avec une forte cohérence interne sont réversibles. En parallèle, nous avons évalué la dynamique d'organisation et le comportement de la SAB, de la Fn et de la DsRed en contact avec des couches minces de silice ou additivées d'AgNPs. Les mesures des angles de contact des gouttelettes de différentes concentrations protéiques ont montré une interaction hydrophile croissante avec la SiO₂th thermique. L'hydrophobicité de surface est modifiée pour les substrats nanocomposites. L'épaisseur et les propriétés optiques des couches protéiques adsorbées ont été évaluées par ellipsométrie spectroscopique. En fonction de la concentration de protéines dans solution les résultats montrent l'évolution d'une monocouche protéique non continue et non dense vers une monocouche plus compacte et plus complexe pour des concentrations élevées. Les images obtenues par microscopie en champs proche ont révélé une organisation protéique sous la forme d'un réseau de type « dentelle » avec la SAB, des structures de type « tiges » avec la DsRed et de type « ramifications » pour la Fn. Les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge montrent les pics caractéristiques de la structure secondaire des protéines. Enfin, l'influence des AgNPs sur l'adhésion de *C. albicans* a été quantifiée *in vitro* en utilisant une méthode hydrodynamique permettant l'application de très faibles contraintes de cisaillement. Une adhésion marquée et maintenue en présence des AgNPs exposées à la surface a été observée. L'interaction avec des AgNPs enterrées à quelques nanomètres de la surface conduit à une forte diminution de l'adhésion de *C. albicans*. La présence d'une couche mince de SAB ou de Fn sur les différents nanocomposites se traduit par des modifications drastiques, avec une augmentation de l'adhésion dans le cas de la Fn et une diminution dans le cas de la SAB. Le travail réalisé démontre l'influence du conditionnement des surfaces sur leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que sur leur évolution au cours de la déshydratation, et leur capacité à être colonisées par des microorganismes.