HAL
open science

Effets de nanoparticules de silice sur la physicochimie de surface de bactéries planctoniques et sur l'architecture des biofilms : analyse par électrophorèse et holotomographie

Elise Vouriot

To cite this version:

Elise Vouriot. Effets de nanoparticules de silice sur la physicochimie de surface de bactéries planctoniques et sur l'architecture des biofilms : analyse par électrophorèse et holotomographie. Sciences de l'environnement. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0278 . tel-02558994

HAL Id: tel-02558994

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02558994v1

Submitted on 30 Apr 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Effets de nanoparticules de silice sur la physico-chimie de surface de bactéries planctoniques et sur l'architecture des biofilms : analyse par électrophorèse et holotomographie

pour l'obtention du titre de

Docteur en Géosciences

de l'Université de Lorraine

Thèse

Présentée par

Elise VOURIOT

Soutenue publiquement le 18 décembre 2019 devant la commission d'examen

EL KIRAT Karim	Rapporteur	BMBI – Université de Compiègne
LARTIGES Bruno	Rapporteur	GET – Université de Toulouse
BELOIN Christophe	Examinateur	Institut Pasteur de Paris
LAGARDE Fabienne	Examinatrice	IMMM – Université du Mans
DUVAL Jérôme F. L.	Directeur de thèse	LIEC – Université de Lorraine
BEAUSSART Audrey	Co-directrice de thèse	LIEC – Université de Lorraine
BIHANNIC Isabelle	Co-encadrante de thèse	LIEC – Université de Lorraine

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | SIReNa

LIEC LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE DES ENVIRONNEMENTS CONTINENTAUX

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier tout particulièrement M. Karim El Kirat, et M. Bruno Lartiges ainsi que M. Christophe Beloin et Mme Fabienne Lagarde qui ont accepté d'évaluer mes travaux.

Merci également à M. Salaheddine Skali-Lami, pour m'avoir tout d'abord enseigné les secrets des fluides complexes à l'ESSTIN puis pour m'avoir orienté vers ce sujet de thèse. Je remercie M. José Paulo Farinha de nous avoir fourni les nanoparticules utilisées et de nous avoir aidé à les maîtriser. Merci également à M. Christophe Beloin et M. Jean-Marc Ghigo de l'unité de génétique des biofilms de l'Institut Pasteur de Paris pour leurs conseils éclairés sur la culture des biofilms. Et, bien évidemment, merci à M. Fabien Thomas et Mme Laure Giamberini, directeurs successifs du LIEC, de m'avoir accueillie dans leurs locaux.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse M. Jérôme Duval, pour la patience dont il a fait preuve et pour son aide et sa volonté à m'inculquer la rigueur et la réflexion scientifique nécessaires à un docteur. Un grand merci également à ma co-directrice de thèse, Mme Audrey Beaussart, qui a toujours su se rendre disponible, pour m'apporter son soutien et ses appréciations toujours bienvenues. Et enfin, un grand merci à ma co-encadrante Mme Isabelle Bihannic pour toute l'aide qu'elle m'a apportée sur chaque aspect de ma thèse, en particulier avec sa maîtrise experte du logiciel Matlab. Tous les trois ont su m'aider, m'appuyer, me former et me conseiller tout au long de ma thèse, et je les en remercie vivement.

Merci à M. Stéphane Desobry et M. Jérôme Sterpenich, directeurs successifs de l'école doctorale RP2E puis SIReNa, à Estelle Barranco, Aurore Binet et Christine Fivet pour leur aide dans les procédures administratives, mais aussi pour la réalisation du label CPE/CDEFI. J'en profite au passage pour remercier les doctorants avec qui j'ai partagé cette formation : Abdoul-Razak Tidjani, Mohamed Chafik Bourkaib, Anne Vicente, Lisa Jeanson, Clémence Lebre et Jordan Poulet.

Un grand merci à Yves Waldvogel, qui m'a beaucoup aidée sur les manipes d'électrophorèse. Et bien évidemment à mes chers compagnons d'aventure Romain Présent et Erwin Henry (Prends bien soin de Schrödi hein !) mais aussi à Renaud Gley, Angélina Razafitianamaharavo, Céline Caillet, Christian Mustin, Thierry Beguiristain, Patrick Billard, Elise Rotureau, Emmanuelle Montarges-Pelletier, Manuel Pelletier, Christophe Gauthier, José Paulo Pinheiro, Aurélie Cébron, Dominique Marandon, Pierre-Yves Arnould et à tous les membres du LIEC et d'Otelo. Merci aussi à Jérôme De Deus pour son aide avec les imprimantes fantômes.

Merci également aux membres du LCPME pour l'aide qu'ils m'ont apportée et pour leurs réponses à mes questions : Laurence Mathieu, Fabienne Quilès, Christophe Merlin, Anais Keraval, Hélène Guilloteau, Edith Angel, David Santilli et Sofiane El Kirat-Chatel.

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé des pauses de midi toujours sympathiques, ponctuées de discussions cinématographiques : Héloïse Gendre (promis je vais venir te voir en Corse), Noémie Janot, Fabrice Fraysse, Laëtitia Hackel, Hélène Guénet, Sophie Fournier, Maxime Geaymond, Bert-Jan Gronenberg, Anthony Luttman, Tiffany Guyonnet, Sophie Romain, Catherine Pierson, Cécile Lorentz et Cécilia Klespert.

Et non je ne vous oublie pas, merci à vous Céline Gaullier, Fatima Meite, Nicolas Grosjean, Ruoyu Hu, Charlotte Berthelot, Kevin Billaudel et Quentin Vincent, membres du LIEC d'Aiguillettes, pour les discussions éclairées, les concours de pâtisserie et les rafraîchissements mérités au King's head. Bien évidemment, un merci spécial à Clotilde Johansson et Gaétan Spada, Rémi Mazerolles, Marie-Astrid Dutoit, Axel Lebreton et Héloïse Verron pour les supers soirées péniches et GoT !

Merci également aux doctorants, et maintenant pour la plupart docteurs, que j'ai croisé à travers mes pérégrinations, et plus particulièrement à Dawid Machala, pour m'avoir appris quelques mots de polonais (Ovietchka !), Mathis Neimard, Florent Canonico, Arturo Padilla, Yussuf Bujwhalla, Loïc Bertrand, Stephen Pierlot, Salvatore Assenza, Lisa Maletzki et Adrianna Kolberg (Girls in Grenoble!), Etienne Berger et Alvarò Ramirez-Santos.

Les copains du TSB de Jarville, même si les volants dans le visage ça fait mal, je ne vous en veux pas (enfin plus trop).

A Apolline, JH, Elsa et Thibaud pour avoir supporté mes déblatérations autour d'un café parisien, et ailleurs. La miss d'Aquitaine, je ne t'oublie pas, un grand merci à toi aussi, et bien sûr à ta moitié. Merci également à Adeline et Frankie pour les rigolades saupoudrées (juste un peu) de Kaamelott.

A tous mes copains de la promo 2016 ESSTIN, et des autres promos (je les aime bien quand même), ainsi qu'aux enseignants, merci d'avoir soutenu une hybride dans ses choix. Une mention spéciale à l'équipe de tous les records de l'*escape* : Constant, Graziella, Benjamin, Maxime, Pauline, Clément, Baptiste et Manon.

A ma belle-famille (au complet, ce qui fait beaucoup), ma famille, et plus particulièrement mon frère, scientifique dans l'âme, ma mère et mon père pour leur soutien indéfectible (Mystère et les petits aussi bien sûr). Papa, nos looongues discussions scientifiques, et non scientifiques aussi d'ailleurs, m'ont été beaucoup plus utiles que ce que tu pourrais croire.

Et comme toujours le meilleur pour la fin. Quentin, merci pour ton soutien sans failles, dans les bons comme dans les mauvais moments, ton recul et ton objectivité. C'est un peu comme si tu avais passé une deuxième thèse avec moi, peu de gens ont cette patience. Dans la tienne, tu avais dit que tu espérais pouvoir me rendre la pareille dans l'aide que je t'avais apportée. Crois-moi, nous sommes largement quittes. Merci. Maintenant on peut passer à la suite !

A mes grands-pères, et à Loki.

Table des matières

Remerciements 2

Table des matières 5

Table des figures 9

Tableaux 16

Table des figures issues de l'article dans le corps du Chapitre 3 18

Tableaux issus de l'article dans le corps du Chapitre 3 20

Glossaire 21

Introduction générale 23

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique 27

I. Les interactions interparticulaires 29

1. Définition d'un colloïde 29

2. La double couche électrique 29

3. Les interactions de van der Waals 33

4. La théorie DLVO 34

5. Les effets stériques 36

6. Les forces d'hydratation 36

7. Les effets hydrophobes 36

8. Les interactions récepteurs-ligands ou clé-serrure 36

II. Les acteurs des interactions 38

1. Les nanoparticules 38

2. Les bactéries 38

2.1 Les *Escherichia coli* 38

2.2 Les biofilms bactériens 39

2.3 Les principaux types de groupements surfaciques bactériens. 40

2.4 La diffusion de particules dans les biofilms 43

III. Les facteurs d'interactions NPs/cellules 46

1. Les appendices et biomolécules de surface des bactéries 46
2. La taille des NPs 46
3. La forme des NPs 48
4. La charge de surface 49
5. Le type de NPs 51
6. La concentration en NPs 52
IV. Les techniques d'analyse 54
1. Les techniques de détection en solution 54
1.1 Le titrage protolytique 54
1.2 L'électrophorèse 54
1.3 Les méthodes à rayons X 56
2. Les techniques d'imagerie 57
2.1 Avec marquage 57
2.1.1 Les microscopies à fluorescence et confocale 57
2.1.2 Les techniques de microscopie à super résolution 60
2.2 Sans marquage 62
2.2.1 La microscopie photonique 62
2.2.2 La microscopie électronique 62
2.2.3 La Microscopie à Force Atomique : 64
2.2.4 L'holotomographie 66
Chapitre 2 : Matériaux, Matériel et Méthodes expérimentales 69
I. Matériel 71
1. Souches bactériennes 71
2. Nanoparticules 74
II. Imagerie des structures pariétales des bactéries et des modifications structurales induites par la présence des NPs 77
1. Microscopie à Force Atomique 77
2. Imagerie à l'air 79

3. Imagerie en liquide 80

III. Détermination de la taille des nanoparticules de silice 82

1. Présentation du NanoZS 82

2. Préparation du batch de nanoparticules 84

IV. Caractérisation électrocinétique des systèmes simples et binaires 85

1. Electrophorèse 85

2. Etude des systèmes simples de particules seules (bactéries ou NPs) 87

2.1 Préparation des batchs de bactéries 87

2.2 Préparation du batch de nanoparticules 89

3. Etude des systèmes binaires NPs/bactéries 89

V. Préparation des biofilms 92

1. Formation d'un biofilm bactérien en microplaque 92

2. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre 93

3. Formation d'un biofilm bactérien en dish 94

4. Formation d'un biofilm avec bactéries et NPs en dish 95

VI. L'holotomographie comme outil d'investigation de la structure des biofilms 98

Chapitre 3 : L'électrophorèse comme méthode simple de détection des actions délétères de nanoparticules manufacturées sur des cellules vivantes 102

Présentation de l'article 103

Electrophoresis as a simple method to detect deleterious actions of engineered nanoparticles on living cells 106

Expérimentations complémentaires 144

Chapitre 4 : L'holotomographie comme technique d'analyse de la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs 148

I. Choix des souches pour l'étude des biofilms 150

II. Holotomographie des biofilms bactériens 151

1. Processus de traitement des données 152

2. Redimensionnement des images en (X, Y) 156

3. Détermination de la zone d'analyse selon Z 156

4. Critère d'Otsu 157

5. Epaisseur du biofilm 159

6. Occupation 160

7. Densité 161

8. Taux de couverture 162

9. Filtre des volumes 162

10. Etude des volumes 165

11. Etude par tranche bactérienne 166

III. Effet des NPs sur la structuration des biofilms 168

1. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules 170

1.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 170

1.2 Etude des domaines 174

2. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence d'une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$ de NPs $SiNH_2$ 180

2.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 180

2.2 Etude des domaines 183

3. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence de 0,4 $g.L^{-1}$ de NPs SiCOOH 189

3.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 189

3.2 Etude des domaines 192

4. Etude comparative 197

Conclusion générale 206

Perspectives 210

Valorisations scientifiques 212

Références 213

Table des figures

Figure 1 : Représentation d'une particule molle soumise à un champ électrique (Duval and Gaboriaud 2010; Ohshima 2000). $\boldsymbol{a}$ est le rayon du cœur de la particule (m), $\boldsymbol{d}$ est l'épaisseur de la couche molle de surface composée de polyélectrolytes chargés (m). 30

Figure 2 : Représentation schématique de la distribution ionique et du potentiel électrostatique à proximité de la surface d'une particule dure selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern. Les ions sont représentés avec leur sphère d'hydratation. Les ions localisés sur le plan d'Helmholtz interne sont séparés de la surface de la particule par d'une distance $\boldsymbol{di}$ (m) e l'ordre du rayon des ions. La distance $\boldsymbol{de}$ (m) est de l'ordre du rayon de l'ion hydraté. Adapté de (Merlin 2012; Présent 2018; Stern 1924). 31

Figure 3 : Représentation schématique d'une particule molle composée d'un cœur dur rigide et d'une couche polymérique perméable. $\boldsymbol{a}$ est le rayon du cœur de la particule (m), $\boldsymbol{d}$ est l'épaisseur de la couche molle de surface composée de polyélectrolytes chargés (m) (Duval and Ohshima 2006; Merlin 2012). 32

Figure 4 : Représentation schématique de la distribution du potentiel électrostatique à une interphase molle (d'après (Merlin 2012; Ohshima 1995)) dans les conditions dites de « Donnan ». 33

Figure 5 : Représentation de l'énergie totale d'interaction $\boldsymbol{VT}$ entre deux particules d'après la théorie DLVO en fonction de la distance interparticulaire $\boldsymbol{r}$. D'après Israelachvili 2011; Merlin 2012. 35

Figure 6 : Schéma d'un biofilm sur une surface abiotique. 39

Figure 7 : Etapes de formation du biofilm : Etape 1 : adhésion réversible ; étape 2 : attachement initial ; étape 3 : formation de micro-colonies ; étape 4 : maturation ; étape 5 : détachement ou dispersion (adapté de Monroe 2007). 40

Figure 8 : Structure en Gram-négatif et en Gram-positif de la membrane bactérienne (adapté de Shahriari *et al.* 2018). 41

Figure 9 : Représentation schématique des appendices de surface d'une bactérie à Gram-négatif et de la composition de sa paroi cellulaire. 43

Figure 10 : Images par MEB de biofilms bactériens, A : Biofilm produisant peu d'EPS, B et C : Biofilm produisant davantage d'EPS et C avec l'apparition de structure en forme champignon. D'après Guiot *et al.* 2002. 44

Figure 11 : Effet de NPs de Silice/polydopamine/argent sur des bactéries à Gram-négatif (*Vibrio natriegens*) et à Gram-positif (*Bacillus subtilis*). A : *Vibrio natriegens*, B : *Vibrio natriegens* + NPs, C : *Bacillus subtilis*, D : *Bacillus subtilis* + NPs. Extrait et adapté d'images obtenues par MET dans Guo *et al.* 2014. 47

Figure 12 : Images obtenues par MEB d'*E. coli* exposées à des NPs TiO_2 à A : pH 5,5, B : pH 9,5. D'après Pagnout *et al.* 2012. 50
Figure 13 : Représentation schématique d'une particule molle soumise à un champ électrique avec l'application du modèle d'Ohshima permettant la détermination des paramètres $\boldsymbol{\rho 0}$ et $\mathbf{1}/\boldsymbol{\lambda 0}$. 56
Figure 14 : Principe de la microscopie confocale (John Innes Centre, Confocal Microscopy, 2017).... 58
Figure 15 : Marqueurs fluorescents pour la détection des constituants des bactéries et des biofilms par microscopie à fluorescence (Bridier *et al.* 2014). 59
Figure 16 : Images 2D et 3D par tomographie de substrats de verre recouverts de pDA sur lesquels ont été appliqué du PEG et/ou du NO avant dépôt de bactéries *Pseudomonas aeruginosa*. D'après Sadrearhami *et al.* 2019. 67
Figure 17 : Représentations 2D et 3D par tomographie de la structure de biofilms de *Pseudomonas* mis en contact avec des NPs d'argent décorées de dérivés de catéchine. a) désigne le biofilm de *Pseudomonas* seules et b) c) et d) des biofilms exposés à des dérivés de la catéchine. Plus précisément d) correspond au biofilm exposé à des NPs d'argent liées à un oligomère de catéchine. D'après Oliver *et al.* 2018. 68
Figure 18 : Expérimentations réalisées dans le but de déterminer l'influence des groupements surfaciques des NPs et des biostructures pariétales bactériennes sur les interactions physico-chimiques entre NPs et bactéries. Le chapitre 3 traite de l'électrophorèse comme méthode de détection des modifications structurales induites par les NPs sur les bactéries. Le chapitre 4 présente l'holotomographie comme technologie permettant l'observation de biofilms bactériens..... 70
Figure 19 : Protocole de réalisation de suspensions bactériennes planctoniques 73
Figure 20 : Images MET des SiNPs..... 75
Figure 21 : Protocole de dispersion de SiNPs pour les mesures par électrophorèse et l'observation par AFM des systèmes NPs/bactéries planctoniques..... 75
Figure 22 : Protocole de dispersion de SiNPs pour la réalisation des biofilms. Les manipulations sont effectuées sous atmosphère stérile. 76
Figure 23 : Principe de fonctionnement de l'AFM (adapté de Présent 2018). 77
Figure 24 : A : Enregistrement des courbes force-distance obtenues pour chaque pixel lors de l'utilisation du mode *Peak Force Tapping* sur un échantillon (Pfreundschuh *et al.* 2014). B : Courbe approche-retrait obtenue pour chacun de ces pixels (adapté de Gaboriaud and Dufrêne 2007)..... 79
Figure 25 : Protocole de réalisation d'échantillons pour des mesures AFM à l'air..... 80
Figure 26 : Protocole de réalisation d'échantillons bactéries + NPs pour des mesures AFM en liquide 81
Figure 27 : Schéma du montage de DLS NanoZS (adapté de Malvern Instruments 2013; Moussa 2017) 82

Figure 28 : Exemple d'une fonction de corrélation obtenue avec le NanoZS (adapté de Kaszuba 2015). 83
Figure 29 : Flux de liquide contenu dans un capillaire sous l'action d'un champ électrique $\boldsymbol{E}$ (adapté de Merlin 2012; Présent 2018)..... 85
Figure 30 : Protocole de préparation des batchs de bactéries pour la mesure de mobilité électrophorétique 89
Figure 31 : Protocole de réalisation des batchs NPs/bactéries pour la mesure de mobilité électrophorétique 91
Figure 32 : Protocole de réalisation de biofilms en microplaques 96 puits et tests au cristal violet ... 93
Figure 33 : Préparation pour observation de l'échantillon sur tomodish (adapté de Tomocube®, Inc) 94
Figure 34 : Protocole de réalisation des biofilms bactériens sur dish..... 95
Figure 35 : Protocole de réalisation des biofilms NPs/bactéries sur dish..... 97
Figure 36 : Principe de la reconstruction d'un volume 3D d'indices de réfraction avec l'holotomographie (adapté de Yoon *et al.* 2015). 99
Figure 37 : Principe de fonctionnement de l'holotomographe de Tomocube® (adapté de Tomocube®) 100
Figure 38 : Principe de fonctionnement de l'holotomographe de Nanolive® (adapté de Nanolive®) 100
Figure 39 : Mobilité électrophorétique des NPs SiCOOH en fonction du pH (indiqué sur la figure) et de la force ionique de la solution de KNO3. Les symboles de couleur correspondent aux données expérimentales. Les lignes correspondent à une reconstruction des données au moyen de la théorie d'Ohshima. Les mesures ont été effectuées sur un équipement Zetasizer NanoZS entre 2 et 3 fois sur des suspensions de NPs SiCOOH nouvellement préparées, et chacune de ces mesures a été efectuée en trois exemplaires. 144
Figure 40 : Diamètre hydrodynamique $\boldsymbol{D}$ des NPs SiCOOH à pH 7 en fonction de la force ionique de la solution de KNO_3. 146
Figure 41 : Signatures électrophorétiques de suspensions mixtes de NPs SiCOOH et bactéries à pH 7 en fonction de la concentration de NPs SiCOOH en solution pour les bactéries E2551 présentant la protéine de surface YeeJ. La force ionique de la solution de KNO est de 1 mM. 'B' signifie bactéries. 147
Figure 42 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 1. Ce logigramme est désigné ensuite par la lettre « A ». 153
Figure 43 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 2. « A » représente le logigramme en **Figure 42**. 154

Figure 44 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 3. « A » représente le logigramme en **Figure 42**. 155
Figure 45 : Opération d'interpolation bilinéaire 156
Figure 46 : A : Explications de l'obtention des MIP. B, C, D : Exemples de représentations des MIP selon les plans de projection (X, Y), (Y, Z) et (X, Z) d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). 157
Figure 47 : Détermination du plan en Z en-dessous duquel le biofilm est considéré comme inexistant. 157
Figure 48 : Application de l'algorithme d'Otsu pour le seuillage automatique d'une image en niveaux de gris (adapté de Greensted 2010). 159
Figure 49 : Détermination de l'épaisseur d'un biofilm. 159
Figure 50 : Représentations de l'épaisseur dans un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D de l'épaisseur selon le plan (X, Y), B : Histogramme des épaisseurs. 160
Figure 51 : Détermination de l'occupation d'un biofilm 160
Figure 52 : Représentations de l'occupation dans un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme des occupations. 161
Figure 53 : Représentations de la densité d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité. 161
Figure 54 : Exemple de calcul de $\boldsymbol{\theta}$ 162
Figure 55 : Pixels 26-connectés 162
Figure 56 : Représentations 3D de l'ensemble des volumes de pixels d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Avant application du filtre à 100 px^3, B : Compris dans le filtre à 100 px^3 et C : Après application du filtre à 100 px^3. 164
Figure 57 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551), dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Projection selon le plan (X, Z) tel que Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Projection selon le plan (X, Y) tel que Z = position maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ». 165
Figure 58 : Exemple de distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) entre 100 et 2000 px^3 166
Figure 59 : Exemple d'histogramme représentant l'évolution du nombre de pixels occupés selon la hauteur Z dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. La hauteur Z est en µm. 167
Figure 60 : Comparaison des images 2D d'occupation, des distributions d'épaisseur (µm), de l'occupation (px), des domaines (px^3), et du décompte du nombre de pixels occupés par groupe de 5 px

de hauteur, pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH..... 169
Figure 61 : Représentations des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de l'épaisseur (nm) en fonction de la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%)..... 170
Figure 62 : Paramètres du modèle gaussien appliqué sur les distributions d'épaisseurs et d'occupation. $\boldsymbol{xc}$ est le centre de la courbe gaussienne, $\boldsymbol{w}$ correspond à la largeur de la courbe et $\boldsymbol{\sigma c = w/2}$. 171
Figure 63 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens. 172
Figure 64 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) dont les 2 contributions sont approximées par des modèles gaussiens. 173
Figure 65 : Représentations de la densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D projetée selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables. . 174
Figure 66 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551), dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ». 175
Figure 67 : Distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale ». 176
Figure 68 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50×50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px. 177
Figure 69 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm..... 179
Figure 70 : Représentations des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). Les cercles blancs correspondent à une cheminée irrégulière de 80 px de hauteur située entre les pixels 100-200 en X et Y. D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de

l'épaisseur (nm) en fonction de la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%). 180
Figure 71 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens. 181
Figure 72 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ dont la contribution est approximée par un modèle gaussien. 182
Figure 73 : Représentations de densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A : Image 2D projetée selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables. 183
Figure 74 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$, dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ». Un cercle rouge de 140 px de diamètre indique la localisation de la cheminée principale. 184
Figure 75 : Domaine maximum du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs. A : Représentation 3D, B : Représentation selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum, un cercle rouge de 110 px de diamètre indique la localisation de la cheminée principale. 185
Figure 76 : Distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale »..... 186
Figure 77 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50×50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px. 187
Figure 78 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm. 188
Figure 79 : Représentation des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de l'épaisseur (nm) en fonction de

la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%). Les cercles blancs correspondent à des agrégats de 50 px². 189
Figure 80 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens. 190
Figure 81 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH dont les 2 contributions sont approximées par des modèles gaussiens. 191
Figure 82 : Représentations de la densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables. 192
Figure 83 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH, dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ». 193
Figure 84 : Distribution des domaines du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale » 194
Figure 85 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50×50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px. 195
Figure 86 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm. 196

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des souches bactériennes *E. coli* étudiées. 72

Tableau 2 : Composition du milieu M63B1glu utilisé pour la pré-culture 1 et la culture des bactéries 73

Tableau 3 : Composition des batchs de 80 mL pour l'étude du comportement électrocinétique des bactéries selon différentes forces ioniques 88

Tableau 4 : Détails de la préparation des suspensions utilisées pour les mesures de mobilité électrophorétiques sur des systèmes binaires NPs/bactéries. 90

Tableau 5 : Volumes des solutions de SiNPs et de M63B1glu à ajouter à la solution bactérienne lors de la réalisation des biofilms. 96

Tableau 6 : Valeurs de densité de charge ρ_0 (mM) et de la longueur de pénétration hydrodynamique $1/\lambda_0$ (nm) obtenues à partir des équations 1-4 (*cf.* Article) du modèle physique analytique d'Ohshima. ρ_0 est exprimé en concentration molaire de charges cationiques ou anioniques monovalentes équivalentes (dépendant du pH), ce qui correspond ratio entre la densité de charge ($C.m^{-3}$) et le nombre de Faraday. 145

Tableau 7 : Estimation de la longueur et du diamètre d'une bactérie selon *regionprops3* en px et en µm, et comparaison du volume d'une bactérie calculé par *regionprops3* et calculé en assimilant la forme d'une bactérie à un cylindre, à partir des longueur et diamètres déterminés par *regionprops3*, en px^3 et $µm^3$. Les calculs ont été effectués en considérant 4 bactéries provenant d'un échantillon composé de bactéries planctoniques. 163

Tableau 8 : Pixels occupés demeurant après application du filtre à 100 px^3. 164

Tableau 9 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs $\boldsymbol{xc}$ et $\boldsymbol{\sigma c}$ relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en **Figure 63** et des 2 contributions de la distribution d'occupation en **Figure 64**, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules. 173

Tableau 10 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs $\boldsymbol{xc}$ et $\boldsymbol{\sigma c}$ relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en **Figure 71** et de la contribution de la distribution d'occupation en **Figure 72**, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. 182

Tableau 11 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs $\boldsymbol{xc}$ et $\boldsymbol{\sigma c}$ relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en **Figure 80** et des 2 contributions de la distribution d'occupation en **Figure 81**, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. 191

Tableau 12 : Comparaison des valeurs d'épaisseur moyenne et de $\boldsymbol{\theta}$ pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH. 198

Tableau 13 : Comparaison des valeurs $\boldsymbol{xc}$ et $\boldsymbol{\sigma c}$ relatives aux centres des contributions des distributions de l'épaisseur et de l'occupation, suite à l'application de modèles gaussiens, pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH. 199

Tableau 14 : Décompte du nombre de pixels occupés dans les « bases » des biofilms par rapport au nombre de pixels de la « base » et au nombre total de pixel occupés dans les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH. 202

Table des figures issues de l'article dans le corps du Chapitre 3

N.B. : Dans le corps de l'article, la numérotation des figures, des tables et des équations est laissée à l'identique que lors de son acceptation par *Environmental Chemistry*. Cette numérotation est indépendante de celle des figures, tableaux et équations présents dans les différentes parties de ce manuscrit de thèse.

Figure 1: Electrophoretic mobility of $SiNH_2$ NPs as a function of pH (indicated) and solution ionic strength (changed upon modification of KNO_3 electrolyte concentration in solution). Colored symbols: experimental data. Lines: data reconstruction by means of Ohshima's theory (eqs 1-4). Measurements, performed with Zetasizer NanoZS equipment (Malvern Instruments®, UK), were carried out on 2 to 5 freshly prepared $SiNH_2$ NPs suspensions, and each of these measurements was done in triplicate. Accordingly, each point in Figure 1 is the average of 6 to 15 measurements..... 114

Figure 2: $SiNH_2$ NPs hydrodynamic diameter D at pH 7 (2a) and pH 3 (2b) as a function of solution ionic strength. Filled symbols correspond to the first mode detected in the number-size distributions obtained by DLS. Empty bullet points correspond to the second mode if applicable. Due to the contribution of protons to the overall solution ionic strength, there are no data points in panel b at 1 mM ionic strength after addition of KNO_3 electrolyte.....118

Figure 3: Electrophoretic mobility of the adopted bacterial strains (nude (E2152), F-pili (E2302) and YeeJ (E2551) cells, indicated) at pH 7 (3a) and pH 3 (3b) as a function of solution ionic strength. Symbols: experimental data. Dotted lines: theory (eqs 1-4). Due to the contribution of protons to the overall solution ionic strength, there are no data points in panel b at 1 mM ionic strength after addition of KNO_3 electrolyte.....120

Figure 4: Electrophoretic fingerprints of mixed bacteria-$SiNH_2$ NPs suspensions at pH 7 and pH 3 (indicated) as a function of $SiNH_2$ NPs concentration in solution for the three cell surface phenotypes of interest (indicated). Solution ionic strength: 1 mM at pH 7 and 2 mM at pH 3. See text for details (§2 and §3.2). 'B' stands for bacteria. 122

Figure 5: AFM peak force error images (3.5 μm × 3.5 μm, 256 pixels × 256 pixels) taken in liquid for E2152, E2551 and E2302 bacteria (indicated) at pH 7 and 3 (indicated) prior to and after incubation with NPs (see details in §2). Red arrows correspond to NPs, white arrows to asperities or depressions,

white squares define 400 nm × 400 nm spatial regions where cell surface roughness features were evaluated……125

Figure 6: Illustrative spatial mapping (400 nm × 400 nm, 28 pixels × 28 pixels) of sample heights derived after application of a Gaussian filter (here, standard deviation σ_1=1) and subtraction from the corresponding raw images. Locations of surface areas where roughness analysis was conducted are provided in Figure 5 for illustration (white squares therein). Bacterial surfaces were imaged at pH 7 and 3 in the presence of 10^{-3} g L^{-1} $SiNH_2$ NPs (indicated). σ_2 corresponds to the standard deviation in height distribution successfully fitted according to a normal distribution law. The black dotted circles are defined by a radius that is equivalent to that of a single NP, and they are positioned at cell surface areas featuring lateral heterogeneities with dimensions reminiscent of NP fingerprints. 'px' stands for pixel. Lines of blue pixels positioned at the image borders correspond to side effects in Gaussian filtration procedure and these pixels were thus not considered for evaluation of σ_2……127

Figure S1: TEM picture of $SiNH_2$ NPs. 139

Figure S2: AFM peak force error images, taken in air, for F-pili (E2302) bacteria at pH 7. The image on the right is a × 5 zoom of the left image. White arrows correspond to F-pili. 140

Figure S3: Illustration of the various steps followed for evaluation of cells surface roughness. The given example pertains to YeeJ (E2551) strain images at pH 7 in the absence of NPs (1 mM solution ionic strength). a: raw image in 3D (left) and 2D (right) (400 nm × 400 nm, 28 pixels × 28 pixels) taken from 3.5 μm × 3.5 μm, 256 pixels × 256 pixels AFM images (obtained under liquid conditions). b: images after application of a Gaussian filter defined by σ_1=0.4, 0.6, 0.8, 1 (indicated). c: images obtained after subtraction of the Gaussian-filtered images from the raw images at σ_1=0.4, 0.6, 0.8, 1 (indicated). d: distributions (given in the form of histograms) of the heights derived from images after subtraction at σ_1 =0.4, 0.6, 0.8, 1 (indicated). Red curves: corresponding fits to normal distribution law (standard deviation σ_2). e: illustrative linear dependence of σ_2 versus σ_1 (slope ω). 'px' stands for pixels..... 141

Figure S4: As in Figure S3, for the nude (E2152) strain imaged in the presence of $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) at pH 3 (2 mM solution ionic strength). 142

Figure S5: As in Figure S3, for the F-pili (E2302) strain imaged in the presence of $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) at pH 3 (2 mM solution ionic strength). 143

Tableaux issus de l'article dans le corps du Chapitre 3

Table 1: Characteristics of the bacteria adopted in this work. 137

Table 2: Values of charge density ρ_0 (in mM) and hydrodynamic penetration length $1/\lambda_0$ (in nm) obtained from eqs 1-4 adopted to recover the electrokinetic data given in **Figure 1**. ρ_0 is expressed in molar concentration of equivalent monovalent cationic or anionic charges (depending on pH), *i.e.* the ratio between charge density (in C m^{-3}) and Faraday number. 137

Table 3: Values of charge density ρ_0 and hydrodynamic penetration length $1/\lambda_o$ at different pH values for the nude (E2152), YeeJ (E2551) and F-pili (E2302) strains obtained from Ohshima's model (eqs 1-4). ρ_0 is expressed in molar concentration of equivalent monovalent anionic charges, *i.e.* from the ratio between charge density (in C m^{-3}) and Faraday number. 138

Table 4: Values of the slopes ω corresponding to the linear plots σ_2 vs. σ_1 for nude (E2152), YeeJ (E2551) and F-pili (E2302) cells at pH 7 and pH 3 in the absence or presence of $SiNH_2$ NPs (indicated). Data correspond to mean values $\pm$ standard deviation as obtained from analysis of 3 to 7 cells per examined condition. Data given at pH 3, without specification of standard deviation, correspond to the analysis of 1 F-pili cell as we encountered significant difficulties in imaging more of these cells under such pH condition, which is possibly due to AFM tip contamination by NPs and/or detached F-pili structures during sample scanning (Figure S2)..... 138

Glossaire

AFM : Microscope (ou Microscopie) à force atomique

ConA : Concanavaline A

DCE : Double couche électrique

DLVO : Théorie établie par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek à propos des forces impliquées dans la stabilité d'une suspension colloïdale

DLS : Diffusion dynamique de la lumière ou *Dynamic Light Scattering*

DO_x : Densité optique correspondant à l'absorbance, proportionnelle à la concentration des cellules, d'une suspension bactérienne pour une longueur d'onde de x nm

E. coli : *Escherichia coli*

EPS : Substances polymériques extracellulaires

EUP : Eau ultra pure

LB : Lysogeny broth

LPS : Lipopolysaccharides

M63B1 glu : Milieu minimum M63B1 + glucose 20 %

MEB : Microscope (ou Microscopie) électronique à balayage

MET : Microscope (ou Microscopie) électronique à transmission

MIP : Projection d'intensité maximale

NaN ou *Not-a-Number* : Valeur pouvant être affecté aux pixels nuls pour les exclure des statistiques

NPs : Nanoparticules

Nue (E2152) ou Nude (E2152) : Souche *E. coli* sans appendices de surface

OMV : Vésicule de la membrane externe ou *outer membrane vesicle*

PALS : Analyse de phase de la diffusion de la lumière ou *Phase Analysis Light Scattering*

PBS : Tampon phosphate salin ou *Phosphate-Buffered Saline*

PCR : Amplification en chaîne par polymérase ou *Polymerase Chain Reaction*

PEI : Polyethylenimine

pili-F (E2302) : Souche *E. coli* présentant des pili-F à sa surface

px : Pixels

QDs : *Quantum dots*

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène ou *reactive oxygen species*

RI : Indice de réfraction

SCF (ou FCS) : Spectroscopie de corrélation par fluorescence

SiCOOH : Nanoparticules de silice fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques

SiNPs : Nanoparticules de silice

$SiNH_2$: Nanoparticules de silice fonctionnalisées avec des groupements amines

VLD : Vélocimétrie laser à effet Doppler

YeeJ (E2551) : Souche *E. coli* arborant la protéine surfacique YeeJ

Introduction générale

Ces dernières années, la société a été témoin du développement considérable des nanotechnologies et de leur utilisation dans des domaines très diversifiés (*e.g.* l'industrie agroalimentaire, la cosmétologie, l'électronique, la pharmacologie et la biomédecine) principalement sous forme de nanoparticules (NPs) (Buzea *et al.* 2007; Svenson 2009; Vidic 2013). Cet essor de l'utilisation de NPs amène à s'interroger sur la manière dont celles-ci sont traitées tout au long de leur cycle de vie, avant leur rejet dans l'environnement. En effet, leur dissémination peut avoir de profondes répercussions sur le fonctionnement des écosystèmes. Il est d'ores-et-déjà acté que ces NPs manufacturées affectent la spéciation d'éléments trace métalliques et perturbent leur cycle biogéochimique (Chai *et al.* 2015; Duval 2017). En outre, les micro-organismes, et plus particulièrement les bactéries, présents dans les milieux aquatiques sont impactés par la présence de ces NPs. Il a par exemple été constaté, du fait de la présence de NPs, une modification de la diversité microbienne (Yang *et al.* 2013b), de la croissance cellulaire (El Badawy *et al.* 2011) ainsi que de la viabilité cellulaire (Stoimenov *et al.* 2002). Par ailleurs, les bactéries s'organisent naturellement sous forme de consortium tridimensionnel appelé biofilm, en s'enveloppant d'une matrice hétérogène constituée de substances polymériques extracellulaires. Cette structure permet d'optimiser les échanges de nutriments entre bactéries, tout en les protégeant du stress extérieur et de la dessiccation (Flemming and Wingender 2010). Ce stress peut être d'origine mécanique (Fonseca and Sousa 2007), provenir d'un changement des conditions du milieu (O'Toole *et al.* 2000), ou des agressions subies du fait d'éléments extérieurs *e.g.* antibiotiques (Costerton *et al.* 1999), composants métalliques (Ordax *et al.* 2010) ou NPs (Choi *et al.* 2010). Entre autres, les NPs sont connues pour affecter la capacité des bactéries à former des biofilms (Ikuma *et al.* 2015). Les implications des rejets de NPs dans l'environnement sont donc réelles, et il apparaît primordial de comprendre les répercussions de la dissémination de ces NPs sur les équilibres physico-chimiques des milieux aquatiques. Les effets toxiques des NPs sur des bactéries sont communément appréhendés par des mesures dose-réponse. Cependant, l'existence d'interactions attractives est une condition obligatoire pour constater des dommages sur les parois bactériennes, des dysfonctionnements cellulaires ou une toxicité. La compréhension des mécanismes menant à ces interactions entre bactéries et NPs permettrait de généraliser les interactions responsables de cette toxicité.

Ainsi, une démarche d'analyse des mécanismes d'interactions des NPs avec le compartiment biotique des écosystèmes, et plus particulièrement avec les bactéries à l'état planctonique et de biofilm, est entreprise dans le but final de pouvoir élaborer à terme des techniques de réhabilitation, ou d'assainissement, et de mettre en place de nouvelles pratiques industrielles écoresponsables.

Les différents types d'interactions (stérique, électrostatique, van der Waals, hydrophobe et/ou clé-serrure) entre NPs et bactéries sont régis par les propriétés de surfaces de ces deux particules. En effet, les bactéries possèdent des propriétés physico-chimiques (*e.g.* électrostatiques, hydrodynamiques) variables selon le type de biostructures surfaciques portées par leur paroi (Francius *et al.* 2011). Il peut s'agir par exemple de structures protéiques filamenteuses de plusieurs µm de long, appelées pili, ou d'une couche protéique répartie sur l'ensemble de la paroi. Leurs fonctionnalités physico-chimiques font partie des facteurs déterminants d'interaction avec les NPs (Beaussart *et al.* 2018a; Beddoes *et al.* 2015). Par ailleurs, ces structures ont chacune un rôle bien précis dans le procédé de formation des biofilms (Flemming *et al.* 2016). De même, il a également été montré que les interactions entre NPs et bactéries dépendent de la nature des NPs (*e.g.* taille, type, groupements surfaciques). L'étude des interactions NPs/bactéries nécessite donc une sélection appropriée de ces NPs. Les NPs métalliques constituent un cas particulier car, du fait de leur dissolution au contact d'un milieu liquide, elles libèrent des ions métalliques pouvant entrainer la mort de la cellule (Choi *et al.* 2010; Vidic 2013).

A ce jour, plusieurs outils existent pour observer et identifier les conséquences d'interactions NPs/bactéries. A l'échelle de la cellule, des techniques comme la microscopie à force atomique (AFM) ou la microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET) sont privilégiées. Il a ainsi pu être mis en évidence la fixation de grappes de NPs sur des surfaces bactériennes (Pagnout *et al.* 2012) ou le déversement de contenu intracellulaire suite à des interactions NPs/bactéries (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017). De plus, l'utilisation de l'AFM permet une observation des bactéries en milieu liquide en évitant les artefacts de séchage et en préservant les structures cellulaires, maintenues dans des conditions proches de celles de leur environnement naturel (Beaussart *et al.* 2018b; Dufrêne 2008). Par ailleurs, il est également possible de mesurer directement les interactions entre NPs et bactéries *via* l'AFM et d'accéder à une répartition des charges de surface cellulaire (Beaussart *et al.* 2018a). Cependant, la détection de ces interactions n'est possible que sur un nombre restreint de cellules. Il n'existe à ce jour aucune technique ne permettant la détection des interactions entre NPs et bactéries à l'échelle de la solution.

Pour l'observation des biofilms, la microscopie à fluorescence confocale est régulièrement sélectionnée. Elle permet une visualisation 3D des biofilms, et des sondes fluorescentes sont utilisées pour rendre compte *e.g.* de la répartition des NPs au sein de la structure, de l'arrangement des bactéries, de la composition des matrices, des zones sacrificielles et des sites de fixation des NPs (Briandet *et al.* 2008; Choi *et al.* 2010; Radzig *et al.* 2013). Néanmoins, l'utilisation de ces sondes peut affecter la physiologie intrinsèque de la cellule (Kim *et al.* 2017). L'holotomographie, une technique de microscopie innovante combinant la tomographie et l'holographie, fournit une représentation 3D directe d'objets transparents, comme les biofilms, sans agents de contraste ou de marquage, en se

basant sur les indices de réfraction de l'échantillon. Des observations ont par exemple déjà été menées afin de déterminer la capacité d'inhibition de la croissance de biofilms bactériens de certains types de NPs (Oliver *et al.* 2018).

Ainsi, ces travaux de thèse s'inscrivent dans une démarche de compréhension des interactions physico-chimiques entre des NPs de silices présentant une surface fonctionnalisée par des groupements terminaux $–NH_2$ ou –COOH (respectivement notées $SiNH_2$ et SiCOOH) et des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) modifiées génétiquement pour présenter de manière sélective différents appendices de surface : des protéines adhésives YeeJ ou des structures filamenteuses protéiques appelées pili-F. Dans ce but, des mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées sur des systèmes isolés de bactéries ou de NPs, et sur des systèmes mixtes, afin de déceler des signatures électrocinétiques des premiers stades d'interaction et de déterminer leur origine en fonction de la concentration en NPs et le pH de la solution. Les modifications structurales induites par la présence de NPs ont été constatées *via* l'AFM, dans des conditions identiques à celles fixées pour l'électrophorèse. L'utilisation de l'holotomographie a permis ensuite de discuter de l'impact des NPs sur la structure de biofilms bactériens selon la nature de leurs groupements fonctionnels surfaciques, à partir de l'établissement de différents proxys renseignant sur l'organisation des bactéries au sein des biofilms.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique présentant une description générale des mécanismes d'interactions possibles entre particules colloïdales. Les différents objets de l'étude sont ensuite décrits en se focalisant sur les appendices de surface des bactéries considérées et sur leur rôle dans la construction des biofilms. Puis, les critères connus engendrant différents types d'interactions entre bactéries (planctoniques et sous forme de biofilm) et de NPs sont présentés, suivis des techniques de caractérisation et de détection de ces interactions. Enfin, les avantages et les inconvénients de chaque technique sont abordés pour justifier le choix de l'électrophorèse, de l'AFM et de l'holotomographie dans notre démarche d'étude.

Le deuxième chapitre s'attache à présenter les souches bactériennes génétiquement modifiées et les NPs fonctionnalisées, ainsi que les différentes méthodes expérimentales utilisées dans le cadre de cette thèse. Des NPs de silice ont été sélectionnées du fait de leur facilité de synthèse et de leur capacité à être modifiées (Pham *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2014; Tan *et al.* 2004; Wang *et al.* 2015). Ainsi, deux types de groupements surfaciques chargés leur ont été attachés, des groupements amines $-NH_2$ et des groupements carboxyliques -COOH, afin de déterminer l'influence de la charge surfacique sur les interactions entre NPs et bactéries. Du fait de leur caractère ubiquiste, et de leur génome séquencé, les bactéries *E. coli* ont été choisies pour cette étude. Plusieurs souches modifiées

génétiquement pour ne présenter qu'un seul type d'appendice surfacique ont été envisagées, afin de déterminer indépendamment leur influence sur les interactions NPs/bactéries.

Dans le chapitre 3 est présenté l'article publié dans le cadre de cette thèse proposant l'électrophorèse comme méthode simple de caractérisation des interactions entre des souches bactériennes *E. coli* ne présentant aucun appendice surfacique (E2152, souche contrôle), arborant des protéines adhésives YeeJ (E2551) ou des structures filamenteuses protéiques pili-F (E2302), et des NPs $SiNH_2$. La détection d'interactions électrostatiques par la mesure de signatures électrophorétiques de dispersions mixtes de NPs et de cellules n'a auparavant, à notre connaissance, pas été réalisée. Ces expérimentations, ainsi que l'évaluation morphologique des cellules bactériennes et de leur rugosité de surface à l'aide de l'AFM, ont permis (i) de détecter les premiers stades d'interactions entre NPs et bactéries, (ii) de constater une modification des caractéristiques électro-hydrodynamiques des bactéries et des NPs due à des modifications de la surface des bactéries et à l'acquisition de bio-couronnes par les NPs suite au relargage de composés cellulaires, (iii) de mettre en avant la dépendance des propriétés électrocinétiques des cellules et des NPs en fonction de la concentration en NPs, du pH de la solution et des appendices surfaciques portés par les bactéries. Il est à noter que la considération de la notion de particule molle est nécessaire afin de rendre compte des propriétés électro-hydrodynamiques des bactéries et des NPs par le biais de l'application du modèle physique analytique d'Ohshima (Ohshima 1995). L'électrophorèse comme méthode de détection d'interactions entre NPs et cellules a ensuite été appliquée à des systèmes SiCOOH – bactéries YeeJ (E2551).

Le chapitre 4 présente le deuxième volet de cette thèse, plus exploratoire, visant à analyser la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs. Après des tests préliminaires visant à sélectionner les souches bactériennes les plus aptes à former des biofilms, une méthode d'exploitation des données d'holotomographie est proposée. Ainsi, un script Matlab a été réalisé afin de déterminer plusieurs proxys pour accéder à la répartition des bactéries au sein des biofilms. A partir de l'estimation du volume d'une bactérie, l'étude de la répartition des pixels au sein du biofilm entier et de sa partie désignée comme « basale » a également été menée. Il a ainsi été montré que la présence de NPs $SiNH_2$ au sein d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) a entrainé la construction de structures type « cheminées » et que les NPs SiCOOH sont restées dispersées dans la partie « supérieure » du biofilm.

Enfin, la conclusion présente une synthèse des résultats majeurs obtenus durant cette thèse, ainsi que des perspectives de poursuite de cette étude.

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

I. Les interactions interparticulaires 29
1. Définition d'un colloïde 29
2. La double couche électrique 29
3. Les interactions de van der Waals 33
4. La théorie DLVO 34
5. Les effets stériques 36
6. Les forces d'hydratation 36
7. Les effets hydrophobes 36
8. Les interactions récepteurs-ligands ou clé-serrure 36
II. Les acteurs des interactions 38
1. Les nanoparticules 38
2. Les bactéries 38
2.1 Les *Escherichia coli* 38
2.2 Les biofilms bactériens 39
2.3 Les principaux types de groupements surfaciques bactériens. 40
2.4 La diffusion de particules dans les biofilms 43
III. Les facteurs d'interactions NPs/cellules 46
1. Les appendices et biomolécules de surface des bactéries 46
2. La taille des NPs 46
3. La forme des NPs 48
4. La charge de surface 49
5. Le type de NPs 51
6. La concentration en NPs 52
IV. Les techniques d'analyse 54
1. Les techniques de détection en solution 54
1.1 Le titrage protolytique 54

1.2 L'électrophorèse 54

1.3 Les méthodes à rayons X 56

2. Les techniques d'imagerie 57

2.1 Avec marquage 57

2.1.1 Les microscopies à fluorescence et confocale 57

2.1.2 Les techniques de microscopie à super résolution 60

2.2 Sans marquage 62

2.2.1 La microscopie photonique 62

2.2.2 La microscopie électronique 62

2.2.3 La Microscopie à Force Atomique : 64

2.2.4 L'holotomographie 66

Cette synthèse bibliographique a pour but de présenter les méthodes de détection des interactions entre bactéries et NPs se produisant à différentes échelles. Dans un premier temps est dressée une liste non exhaustive des interactions interparticulaires possibles au sein de suspensions colloïdales impliquant les deux objets de l'étude : les bactéries et les NPs. Ces deux types de particules sont ensuite présentés, et un accent est mis sur les différents types de biostructures surfaciques des bactéries, connues pour influer sur leur capacité de formation de biofilms et sur la diffusion d'agents extérieurs au sein de ces biofilms. S'ensuit une présentation des différents facteurs entrainant des interactions entre NPs et cellules bactériennes à l'état planctonique et de biofilm. Enfin une description des différentes méthodes utilisées pour détecter et catégoriser ces interactions est fournie. Ces méthodes permettent de déterminer quels types d'interactions se produisent à nano-échelle (cellule unique ou particule), à l'échelle de la solution et à macro-échelle (biofilms).

I. Les interactions interparticulaires

1. Définition d'un colloïde

Le terme colloïde étant utilisé dans la suite de ce manuscrit, il est important de le définir. Ce terme a été utilisé pour la première fois par Graham en 1861 et référait à une substance gélatineuse qualifiée de *glue-like* (Graham 1861). Actuellement, la définition la plus commune est basée sur un critère de taille et renvoie à une entité dont au moins une dimension selon la direction x, y ou z est comprise entre 1 nm et 1 µm (Lyklema 1991a; McNaught *et al.* 2014). Ces entités, chargées électriquement, peuvent être solides, liquides ou gazeuses et sont dispersées dans un milieu. Ainsi, il existe de nombreuses sortes de colloïdes, dont par exemple les colloïdes inorganiques comme les métaux et les argiles, les émulsions comme les crèmes ou la vinaigrette, les fumées ou les particules polymériques présentes notamment dans les peintures. Enfin, les effets de gravitation sur les colloïdes sont négligeables devant l'agitation thermique ce qui a pour conséquence une absence de sédimentation des particules (Satake *et al.* 1996).

2. La double couche électrique

Deux types de particules sont retrouvées dans l'environnement : les particules dites dures et les particules dites molles. Les particules dures sont homogènes et imperméables aux ions et au solvant dans lequel elles se trouvent. De plus, elles portent leurs charges uniquement à leur surface. Les particules molles possèdent, ou non, un cœur dur de rayon a entouré d'une couche de polymères, perméable au solvant, d'une épaisseur d (**Figure 1**). Il peut s'agir *e.g.* de bactéries présentant diverses biostructures de surfaces de plusieurs nanomètres à plusieurs micromètres de long (Duval and Gaboriaud 2010).

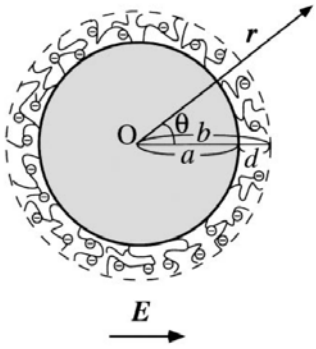


Figure 1 : Représentation d'une particule molle soumise à un champ électrique (Duval and Gaboriaud 2010; Ohshima 2000). a est le rayon du cœur de la particule (m), d est l'épaisseur de la couche molle de surface composée de polyélectrolytes chargés (m).

Les particules, ou colloïdes, acquièrent une charge surfacique ou volumique lors de leur mise en contact avec un milieu aqueux. La présence de ces charges induit un potentiel électrostatique à l'interface liquide/particule. La charge d'un colloïde provient de l'adsorption ou la désorption de certains types d'ions liés fortement à la surface et appelés potentiels déterminants, la ionisation ou la dissociation des groupements surfaciques existants, l'adsorption de molécules chargées (*e.g.* tensioactifs), la substitution isomorphique[1] ou l'adsorption spécifique d'ions (*e.g.* hydroxyde, ions métalliques). L'établissement de cette charge génère un champ électrostatique et la distribution des ions à la surface du colloïde se fait de sorte à ce que la charge surfacique ou volumique soit neutralisée. L'attraction des ions de charge opposée à celle de la surface, ou contre-ions, et la répulsion des ions de même charge, ou co-ions, ont pour effet de créer une structure ionique appelée double couche électrique (DCE).

Stern a concilié en 1924 les différents modèles de DCE établis par Helmholtz, Gouy et Chapman (Chapman 1913; Gouy 1910; Helmholtz 1879; Stern 1924) en créant un modèle prenant en compte la taille finie des ions ainsi que l'agitation thermique. La DCE se décompose en deux couches : une couche compacte, dite couche de Stern, solidaire de la surface de la particule, et une seconde couche, que l'on qualifie de couche diffuse. Ainsi, la première couche (**Figure 2**), est une couche divisée en deux parties. La première partie de cette couche de Stern est délimitée par le plan d'Helmholtz interne, situé à une distance de la surface de la particule de l'ordre du rayon des ions adsorbés sur la surface chargée. La seconde partie est délimitée par le plan d'Helmholtz externe, situé à une distance de l'ordre du rayon des ions hydratés depuis la surface de la particule. Ces ions sont attirés par la surface de la particule chargée.

[1]La substitution isomorphique consiste en un remplacement des ions par des ions de même type avec une valence moindre.

La deuxième couche est appelée la couche diffuse, ou la couche de Gouy-Chapman, et débute au plan d'Helmholtz externe. La distribution du potentiel électrostatique dans la couche diffuse se fait selon l'équation de Poisson-Boltzmann. A la surface du colloïde on a un potentiel de surface appelée ψ_0 qui décroit depuis la surface de colloïde jusqu'au cœur de la solution, à un potentiel nul. Le potentiel électrostatique entre la couche de Stern et la couche de Gouy-Chapman est le potentiel électrostatique ψ_d. Par ailleurs, l'épaisseur de la DCE est assimilée à la longueur de Debye κ^{-1}.

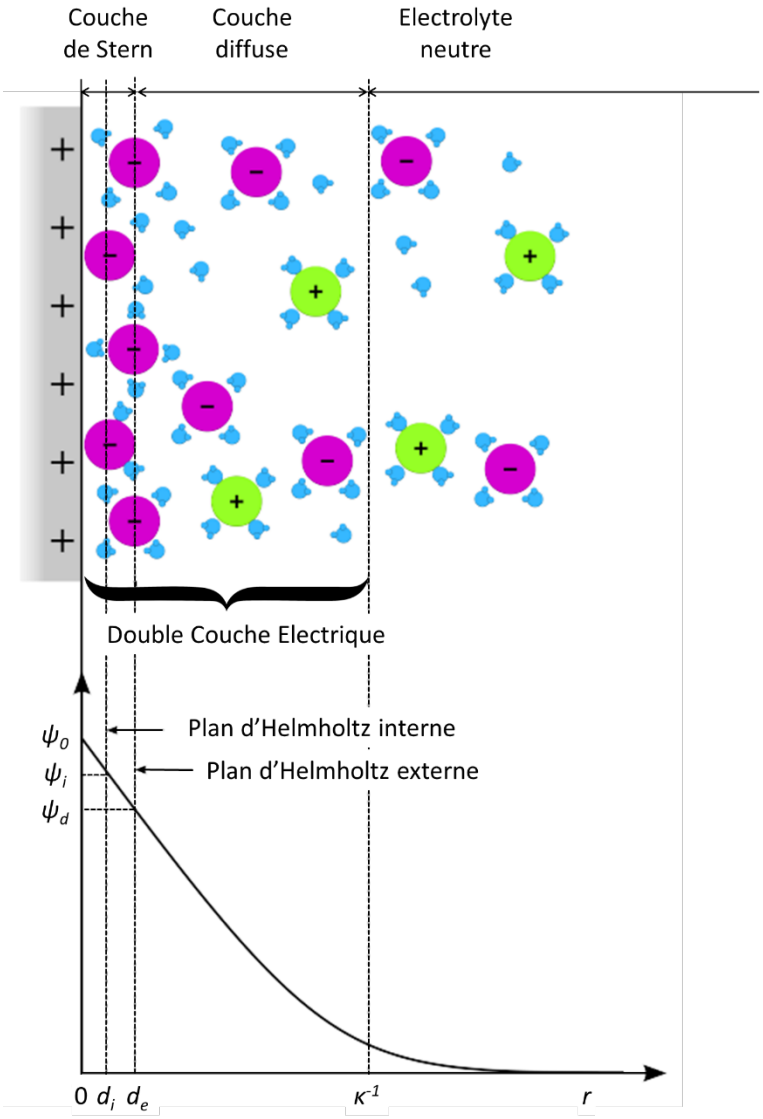


Figure 2 : Représentation schématique de la distribution ionique et du potentiel électrostatique à proximité de la surface d'une particule dure selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern. Les ions sont représentés avec leur sphère d'hydratation. Les ions localisés sur le plan d'Helmholtz interne sont séparés de la surface de la particule par d'une distance d_i (m) e l'ordre du rayon des ions. La distance d_e (m) est de l'ordre du rayon de l'ion hydraté. Adapté de Merlin 2012; Présent 2018; Stern 1924.

Pour déterminer les caractéristiques de cette DCE, des techniques électrocinétiques comme l'électrophorèse sont utilisées (**§ IV.1**). Cette dernière consiste à appliquer un champ électrique sur une dispersion de particules colloïdales. Sous l'action de ce champ, les particules portant une charge électrique non nulle entrent en mouvement. La mobilité électrophorétique μ est alors mesurée. Elle représente le déplacement des particules chargées dispersées dans un milieu aqueux contenu dans un capillaire fermé sous l'action d'une champ électrique continu. Ainsi, la vitesse de migration v des particules (m.s^{-1}), sous l'effet du champ électrique, est relevée et divisée par la valeur de champ électrique appliqué E (V.m^{-1}) (**Equation 1**).

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \textbf{(1)}$$

Lors de l'application de ce champ électrique, la couche stagnante, située entre la surface de la particule et le plan d'Helmholtz externe, ne suit pas le mouvement hydrodynamique du fluide autour de la particule et reste fixe. Au-delà de ce plan, la couche supérieure est non solidaire de la surface et donc mobile. Dans le cas de particules dures, le plan entre la couche stagnante et la couche mobile se nomme le plan de cisaillement, ou plan de glissement. Le potentiel électrostatique à ce plan est appelé le potentiel zêta, et il est calculé à partir de la mobilité électrophorétique. Cependant, dans le cas de particules molles, la définition de ce plan de cisaillement devient impossible du fait de la présence d'une couche polymérique d'épaisseur d perméable aux ions et la DCE s'étend vers la solution et à l'intérieur de la couche polymérique (**Figure 3**). La notion de potentiel zêta est alors dénuée de sens physique et inapplicable.

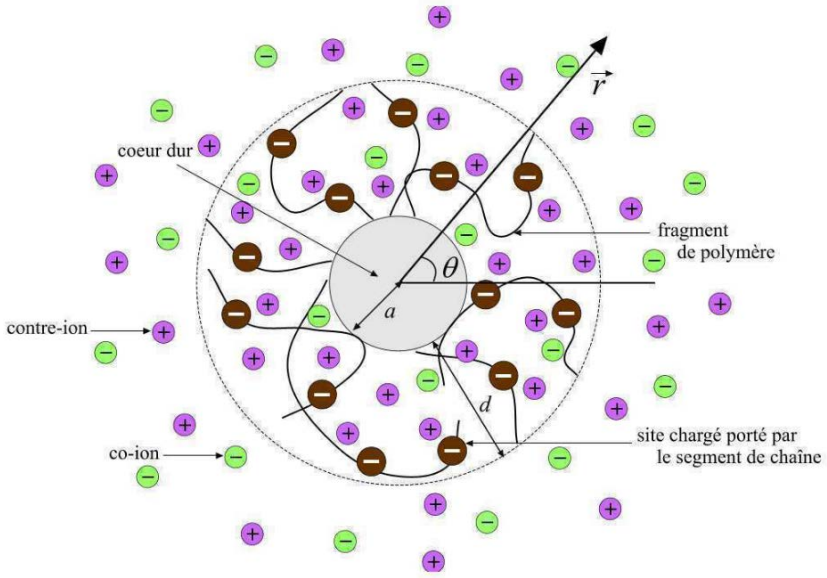


Figure 3 : Représentation schématique d'une particule molle composée d'un cœur dur rigide et d'une couche polymérique perméable. a est le rayon du cœur de la particule (m), d est l'épaisseur

de la couche molle de surface composée de polyélectrolytes chargés (m) (Duval and Ohshima 2006; Merlin 2012).

La distribution des potentiels électrostatiques s'en trouve modifiée. Ainsi, si l'épaisseur de la couche polymérique est très supérieure à la longueur de Debye κ^{-1}, le potentiel de Donnan ψ_{Don} désigne le potentiel au cœur de cette couche (**Figure 4**). L'épaisseur de la DCE intraparticulaire est désignée par κ_m^{-1}.

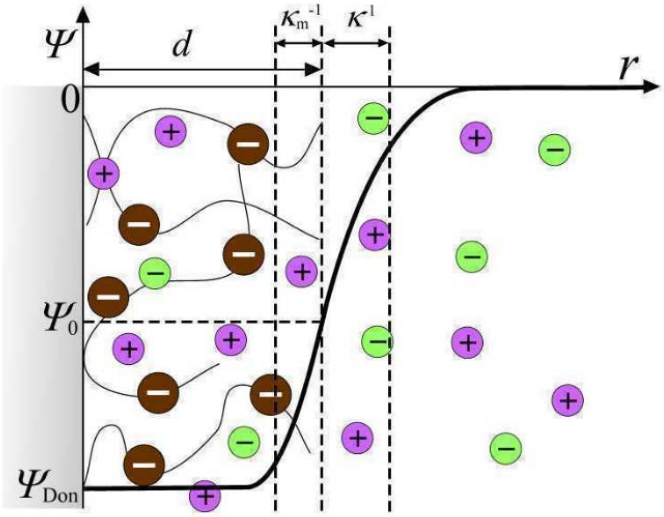


Figure 4 : Représentation schématique de la distribution du potentiel électrostatique à une interphase molle (d'après Merlin 2012; Ohshima 1995) dans les conditions dites de « Donnan ».

Des modèles physiques analytiques et numériques permettent, à partir de la mobilité électrophorétique, d'accéder aux propriétés électrostatiques des particules. Plusieurs d'entre eux sont mentionnés en **§ IV.1**.

Ainsi, les charges positives et négatives, présentes aussi bien dans le corps de la particule qu'à sa surface, sont responsables des interactions électrostatiques qui peuvent se produire entre ces mêmes particules et d'autres éléments chargés existant en solution.

3. Les interactions de van der Waals

Les forces intermoléculaires de van der Waals consistent en des interactions attractives entre dipôles électriques. Elles naissent des fluctuations des nuages électroniques autour de noyaux en générant des dipôles. Il existe trois groupes d'interactions de van der Waals :

- les forces de Keesom liées aux interactions entre deux dipôles permanents ou molécules polaires ;

- les forces de Debye dues aux interactions entre dipôle permanent/ molécule polaire et – dipôle induit/ molécule non polaire. La molécule non polaire est polarisée du fait de la présence de la molécule polaire ;
- les forces de London générées par les mouvements des électrons au sein des molécules et se produisant entre deux molécules apolaires ou dipôles induits. Il s'agit de la plus forte contribution aux interactions de van der Waals (Breuer 2000; Merlin 2012).

Ces différentes forces sont d'autant plus importantes que les particules se rapprochent.

4. La théorie DLVO

La théorie DLVO, établie par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek, explique que les deux types de forces impliquées dans la stabilité d'une suspension colloïdale sont les forces électrostatiques répulsives et les forces de van der Waals attractives. La compétition entre ces deux forces gouverne la stabilité d'une suspension colloïdale. Dans le cas où les forces attractives sont plus importantes que les forces répulsives, les particules présentes dans la suspension s'agrègent. A l'inverse, si les forces répulsives prédominent, le système est stable et la suspension colloïdale résiste au phénomène d'agrégation et est alors dispersée (Derjaguin and Landau 1993; Verwey and Overbeek 1948).

L'épaisseur de la DCE κ^{-1} et le potentiel zêta sont les paramètres prédominants dans la détermination de l'énergie de répulsion électrostatique entre deux particules chargées séparées par une distance r. Il est à noter que l'augmentation de la concentration en ions en solution génère un phénomène d'écrantage de la charge de surface des particules, ayant pour effet de diminuer le potentiel zêta, l'épaisseur des DCE et la force de répulsion entre les particules (Israelachvili and Pashley 1982; Liang *et al.* 2007; Park and Seo 2011).

Ainsi, l'énergie totale d'interaction V_T correspond à la somme de l'énergie d'interaction répulsive V_R et de l'énergie d'interaction attractive V_A. Une représentation de l'évolution de cette énergie totale en fonction de la distance interparticulaire est disponible en **Figure 5**.

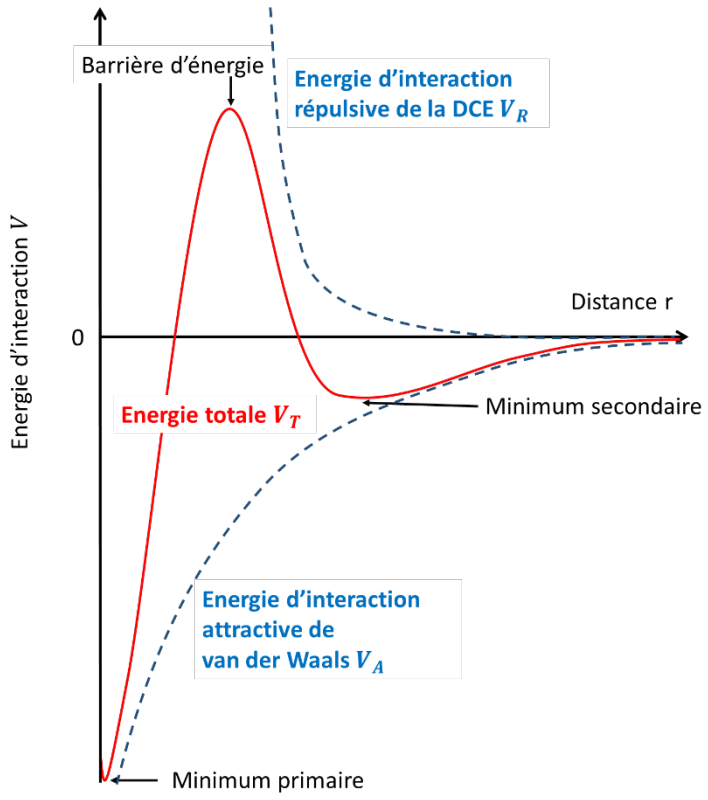


Figure 5 : Représentation de l'énergie totale d'interaction V_T entre deux particules d'après la théorie DLVO en fonction de la distance interparticulaire r. D'après Israelachvili 2011; Merlin 2012.

Lorsque les potentiels zêta sont importants, *i.e.* signifiant une charge élevée de la particule et/ou une force ionique faible du milieu, une barrière d'énergie est générée. Cette barrière découle de l'énergie des interactions répulsives et empêche l'agrégation des particules, ce qui a pour effet de rendre la suspension colloïdale stable. Le minimum secondaire apparaît lorsque la force ionique de la solution augmente et que la barrière d'énergie diminue. Pour une force ionique très élevée, la charge de surface des particules est écrantée ce qui a pour conséquence une diminution de l'épaisseur de la DCE et une diminution de la portée des interactions électrostatiques répulsives. Les forces de van der Waals dominent alors, ce qui a pour conséquence une agrégation des particules.

Par ailleurs, lorsque des interactions électrostatiques se produisent entre deux particules, les DCE de ces deux particules se recouvrent et des procédés de transport et de transfert d'ions à l'intérieur et à l'extérieur des DCE, que l'on appelle processus de relaxation, ont lieu. Ils entrainent une réorganisation des distributions spatiales des ions des nuages ioniques entourant les particules et des variations locales de potentiels électrostatiques. Cependant, la théorie DLVO est valable pour les DCEs à l'équilibre quelle que soit la distance de séparation des particules, et elle ignore les phénomènes dynamiques de réorganisation des DCE (Lyklema 1991a; Lyklema *et al.* 1999).

5. Les effets stériques

Les effets stériques sont des forces répulsives qui interviennent lorsque les surfaces des particules colloïdales en interaction sont recouvertes de chaînes polymériques. Ces interactions sont non liantes et influencent la conformation des chaînes polymériques surfaciques. Lorsque les particules se rapprochent, l'encombrement causé par les chaînes polymériques maintient les particules à une distance telle que les interactions attractives de van der Waals ne rentrent pas en compte. Ainsi, les particules demeurent dispersées dans le milieu (Kitchens *et al.* 2003; Merlin 2012).

6. Les forces d'hydratation

Les forces d'hydratation sont des forces répulsives à courte portée. L'hydratation des ions consiste en l'établissement de liaisons de molécules d'eau autour des ions d'une solution aqueuse. Ces molécules d'eau s'orientent selon la charge de l'ion et forment ainsi une sphère d'hydratation autour de l'ion. La charge des ions est donc en partie masquée par la présence de ces molécules d'eau, et plus les ions sont hydratés, moins ils sont efficaces pour écranter la charge de la surface de la particule considérée. Les liaisons entre molécules d'eau et ions tendent à éloigner suffisamment les ions négatifs et positifs de la solution les uns des autres pour qu'ils résistent aux forces d'attractions coulombiques. La suspension colloïdale est alors stable contrairement aux prédictions de la théorie DLVO (Israelachvili 2011b; Lyklema 1991a; Valle-Delgado *et al.* 2005).

7. Les effets hydrophobes

Dans le cas où des particules présentent une affinité réduite avec le milieu aqueux dans lequel elles se trouvent, des forces attractives hydrophobes interviennent. L'effet hydrophobe résulte en une attraction entre des surfaces (ou molécules) hydrophobes, non polaires, en milieu aqueux. Les molécules hydrophobes se regroupent pour limiter leur surface de contact avec l'eau, ce qui se traduit par leur agrégation (Israelachvili and Pashley 1982).

De manière plus précise, afin de préserver ses liaisons hydrogène, reposant sur l'interaction entre l'atome H d'une molécule polarisée et des doublets d'électrons non-liants de molécules voisines, les molécules d'eau vont se réorienter à la surface des molécules non polaires de la solution (Doyle 2000). La balance hydrophobe/hydrophile de la surface à coloniser et d'une bactérie constitue par exemple un des facteurs de la formation du biofilm (Palmer *et al.* 2007; Van Loosdrecht *et al.* 1987). Par ailleurs, certaines études ont montré que seule l'attraction à très courte portée de particules peut être considérée comme résultant d'un effet hydrophobe (Meyer *et al.* 2006).

8. Les interactions récepteurs-ligands ou clé-serrure

Ce type d'interaction repose sur le modèle de Fisher, basé sur le principe de complémentarité de forme parfaite entre enzyme et substrat possédant des formes géométriques spécifiques (Fisher 1894). Cela

implique qu'aucune déformation n'est à constater lors de l'interaction entre le substrat et la cavité du site actif (Fisher 1894; Sullivan and Holyoak 2008). Ce type d'interaction est utilisée par exemple pour détecter des enzymes avec des NPs (Cha *et al.* 2015). En outre, lorsque des NPs s'entourent d'une couronne protéique, cette couronne peut contrôler et empêcher les interactions des NPs avec les récepteurs en surface de la cellule, auxquels elles devaient initialement se lier (Fleischer and Payne 2014). Enfin, l'utilisation des *Quantum Dots* (QDs) (***cf.* § III.1**) repose sur ce type d'interactions, car ils permettent de cibler des ligands particuliers comme les anticorps et les peptides et sont ainsi utilisés comme biomarqueurs en médecine pour repérer *e.g.* des tumeurs (Pinaud *et al.* 2011; Smith *et al.* 2008).

II. Les acteurs des interactions

1. Les nanoparticules

La définition d'une NP se base sur un critère de taille et diffère selon les études. Dans la littérature, il est dit qu'une NP peut désigner une particule dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm (Delay and Frimmel 2012; Ricaud and Witschger 2012). D'autres auteurs annoncent qu'une NP peut être considérée comme telle si sa taille est inférieure à 1000 nm (Buzea *et al.* 2007). Les NPs peuvent être d'origine naturelle, provenant alors *e.g.* de phénomènes d'érosion des roches, des activités volcaniques ou de feux de forêts. Elles sont dorénavant de plus en plus source d'interrogations car produites et utilisées dans les activités industrielles humaines (*e.g.* industrie agroalimentaire, électronique, cosmétiques, pharmaceutiques, biomédical) et étant par conséquent disséminées dans l'écosystème (Buzea *et al.* 2007; Ju-Nam and Lead 2008; Svenson 2009; Vidic 2013).

Les capacités d'interaction des NPs avec leur environnement dépend, entre autres, de critères de taille (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Shang *et al.* 2014), de forme (Pal *et al.* 2015), de charge de surface (Ikuma *et al.* 2015; Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Stoimenov *et al.* 2002) et de leur composition (Stoimenov *et al.* 2002; Vidic 2013). La concentration des NPs au sein du milieu dans lequel elles se trouvent (Brayner *et al.* 2006; Fabrega *et al.* 2009), le pH, la force ionique de ce même milieu (Beaussart *et al.* 2018b; Pagnout *et al.* 2012) et, par suite, leur tendance à l'agrégation (Pagnout *et al.* 2012; Planchon *et al.* 2013) sont également des paramètres à prendre en compte.

Enfin, certains effets de ces NPs sont d'ores-et-déjà connus. Elles sont par exemple capables de perturber le cycle biogéochimique des écosystèmes dans lesquelles elles sont dispersées (Chai *et al.* 2015). Elles ont également la possibilité d'interagir avec des systèmes biologiques, d'y pénétrer et/ou de les endommager, d'affecter la croissance cellulaire, la viabilité cellulaire et la capacité des bactéries à former des biofilms (Chai *et al.* 2015; Choi *et al.* 2010; El Badawy *et al.* 2011; Ikuma *et al.* 2015; Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Stoimenov *et al.* 2002). Il a également été démontré que les NPs peuvent traverser les barrières épidermiques et se loger dans le système lymphatique des êtres vivants (Buzea *et al.* 2007; Zensi *et al.* 2009).

2. Les bactéries

2.1 Les Escherichia coli

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes, vivant principalement dans notre environnement sous forme d'une structure tridimensionnelle complexe appelée biofilm, où elles sont liées entre elles par des exopolymères.

Dans cette thèse les *Escherichia coli* (*E. coli*), ou colibacilles, des entérobactéries à Gram-négatif ubiquistes, sont sélectionnées comme microorganismes modèles. Les *E. coli* sont présentes dans les eaux et les sols, et vivent en commensalisme au sein de l'intestin des mammifères en tant que constituant du microbiote (Beloin *et al.* 2010; Berg 2004). Ainsi, la majorité des souches d'*E. coli* sont non pathogènes. Cependant, les souches pathogènes de cette bactérie causent d'importants troubles digestifs, des infections urinaires, des méningites ou des septicémies (Berg 2004; Kaper *et al.* 2004). Elles sont les souches bactériennes les plus étudiées, car elles se distinguent par leur rapidité de culture (entre 20 et 60 minutes) et leur génome est entièrement connu et séquencé, rendant toute manipulation génétique aisément praticable. Ce génome contient 4,6 millions de paires de bases et code pour 4000 polypeptides différents (Berg 2004). De plus, les bactéries *E. coli* sont connues pour former des biofilms sur des surfaces abiotiques dans des conditions environnementales variées (Genevaux *et al.* 1996; O'Toole *et al.* 2000; Vidal *et al.* 1998).

2.2 Les biofilms bactériens

Un biofilm est une communauté de bactéries planctoniques qui s'attachent sur une interface solide-liquide et s'agrègent entre elles en s'enveloppant d'une matrice protectrice hétérogène (**Figure 6**) de substances biopolymériques extracellulaires hydratées (substances polymériques extracellulaires ou EPS) sécrétées par ces mêmes bactéries (Branda *et al.* 2005; Flemming and Wingender 2010; Neal *et al.* 2007). Ces EPS sont principalement des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et des lipides (Flemming and Wingender 2010). Ils sont responsables de l'apparence gélatineuse et turbide du biofilm. Etre sous forme de biofilms permet aux communautés bactériennes de lutter contre le stress (*e.g.* stress osmotique, stress oxydatif, séchage, manque de nutriments) (Aldeek *et al.* 2011; Beloin *et al.* 2010; Costerton *et al.* 1995; Flemming and Wingender 2010; Flemming *et al.* 2016; O'Toole and Kolter 1998; Whitfield *et al.* 2015) et les agressions par des éléments extérieurs (*e.g.* phages, antibiotiques, NPs) (Beloin *et al.* 2010; Choi *et al.* 2010; Costerton 1999; Costerton *et al.* 1995; O'Toole and Kolter 1998; Stewart and Costerton 2001; Vidakovic *et al.* 2017; Whitfield *et al.* 2015).

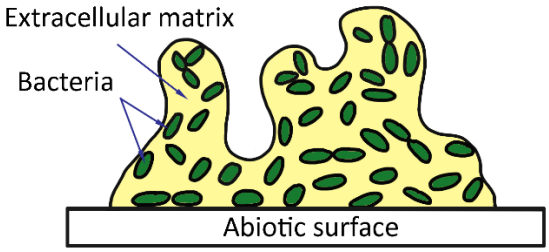


Figure 6 : Schéma d'un biofilm sur une surface abiotique

Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation d'un biofilm (**Figure 7**). Dans un premier temps, les bactéries viennent au contact du support. On parlera alors d'adhésion réversible car elles ne sont pas

encore fixées sur le substrat. Ensuite, dans la phase d'attachement initial, les différents appendices de surface et les EPS permettent aux bactéries de se fixer sur leur surface d'accueil. Après cette phase, les bactéries procèdent à des échanges physiologiques afin de progressivement les amener à leur état sessile appelé biofilm (Jouenne 2016; Monroe 2007). Des micro-colonies se forment ensuite par division des bactéries. Puis, les EPS constituant la matrice sont sécrétés en quantité importante. On parle de maturation du biofilm. Enfin, le vieillissement du biofilm, ainsi qu'un manque de nutriments, induisent un détachement de bactéries planctoniques qui se dispersent et colonisent de nouvelles surfaces pour, à nouveau, se développer sous forme de biofilm.

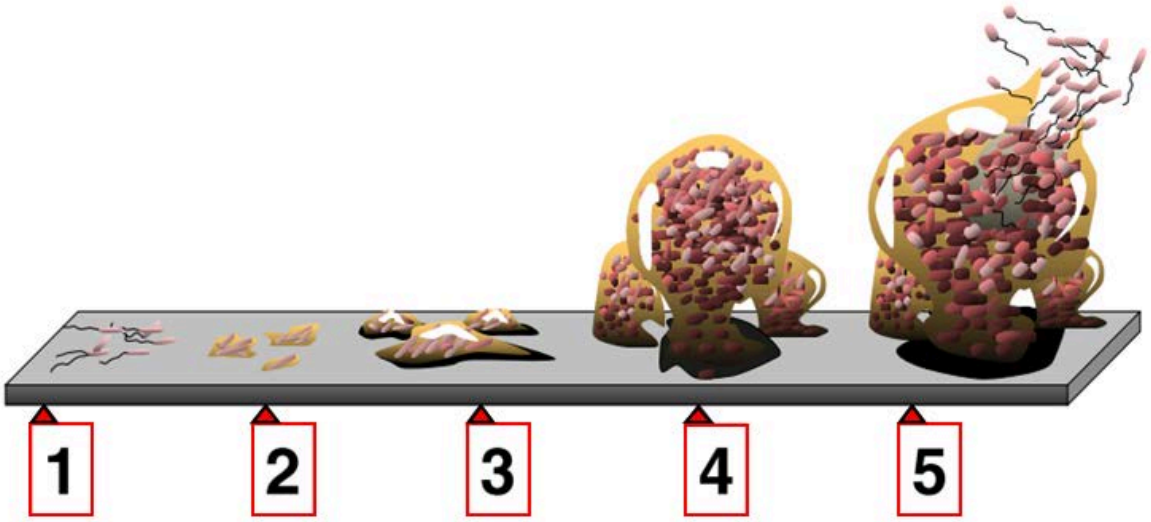


Figure 7 : Etapes de formation du biofilm : Etape 1 : adhésion réversible ; étape 2 : attachement initial ; étape 3 : formation de micro-colonies ; étape 4 : maturation ; étape 5 : détachement ou dispersion (adapté de Monroe 2007).

Les biofilms constituent une difficulté majeure dans l'industrie et les domaines médicaux (*e.g.* canalisations, échangeurs de chaleur, chaînes de production, prothèses) car ils induisent des effets de corrosion et sont difficiles à éradiquer (Culha *et al.* 2015; Jouenne 2016; Parsek and Singh 2003). De plus, ils se montrent très résistants aux effets des NPs, comme explicité dans (Choi *et al.* 2010). Dans cet article est étudiée la résistance des biofilms d'*E. coli*, par rapport aux bactéries planctoniques, face à des agents antimicrobiens (des NPs d'argent). Il apparaît que ces biofilms sont 4 fois plus résistants à l'inhibition de croissance causée par des NPs d'argent (15 à 21 nm de diamètre) que les bactéries planctoniques.

2.3 Les principaux types de groupements surfaciques bactériens.

Les bactéries sont à catégoriser selon deux types de structures principales : les bactéries dîtes à Gram-négatif et celles à Gram-positif (Beveridge and Graham 1991) (**Figure 8**). Le composant principal des

parois cellulaires bactériennes est le peptidoglycane, constitué de polysaccharides et de peptides. L'épaisseur totale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif est comprise entre 20 et 80 nm, tandis que celle des bactéries à Gram-négatif est comprise entre 1,5 et 10 nm. Cette épaisseur découle principalement de l'épaisseur des couches de peptidoglycane (Mai-Prochnow *et al.* 2016). En effet, une épaisse couche de peptidoglycane constitue la surface externe des bactéries à Gram-positif. Les bactéries à Gram-négatif possèdent quant à elles une couche de peptidoglycane plus fine incluse entre deux membranes, la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Cette membrane externe est composée d'une double couche de phospholipides, de protéines et de polysaccharides. La fonction première de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif est la protection de la bactérie face à la perte de constituants ou à l'entrée d'éléments extérieurs susceptibles d'endommager la bactérie. Les porines, présentes dans la membrane externe, sont des protéines agissant comme des canaux et permettant à des molécules hydrophiles de l'environnement extérieur de pénétrer à l'intérieur de la bactérie, sous réserve que leur taille soit inférieure à 600 Da (Benz 1990; Benz and Bauer 1988).

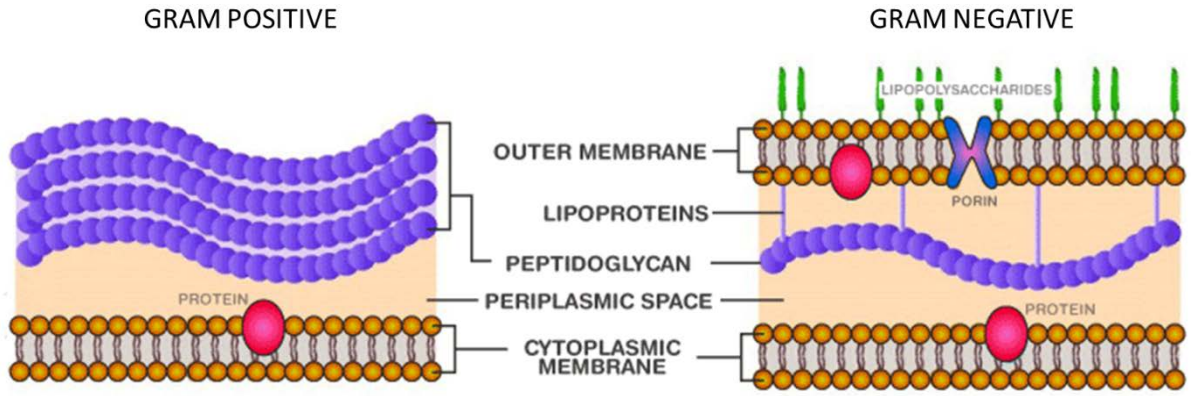


Figure 8 : Structure en Gram-négatif et en Gram-positif de la membrane bactérienne (adapté de Shahriari *et al.* 2018).

Sur la membrane externe des bactéries sont fixées plusieurs types de structures (**Figure 9**) :

Les lipopolysaccharides (LPS) :

Constitués d'un lipide et d'un polysaccharide, ils contribuent à l'intégrité structurelle de la membrane, et servent à l'adhérence de la matrice du biofilm sur une surface biotique ou abiotique. Leur poids peut s'élever jusqu'à 25 kDa (Beloin *et al.* 2010; Escobar *et al.* 1997). Les LPS constituent 75 % de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Le Brun *et al.* 2013).

Les pili-F constitutifs :

Également appelés les pili sexuels, ce sont de longs filaments flexibles constitués de protéines. Ils facilitent les échanges génétiques entre les bactéries durant les processus de conjugaison et interviennent dans l'attachement initial du biofilm. Ils permettent également de stabiliser le biofilm en connectant les cellules entre elles (Molin and Tolker-Nielsen 2003). Ils ont une longueur bien supérieure aux autres pili, car ils peuvent atteindre 20 µm, et leur épaisseur est inférieure à 10 nm (Beloin *et al.* 2010; Costa *et al.* 2016; Wang *et al.* 2009).

Les fimbriae ou pili :

Les termes fimbriae et pili, lorsqu'ils désignent d'autres pili que les pili-F, ont été historiquement mélangés pour désigner les mêmes structures. Ici seront désignés par fimbriae des filaments protéiques généralement longs de 0,2 à 2 µm. A l'extrémité de certains d'entre eux se trouve une adhésine, qui est un type de protéine permettant un attachement à une cible. Ces appendices gardent les cellules éloignées les unes des autres pour optimiser les échanges de fluides et les accès aux nutriments à toutes les cellules des biofilms (Beloin *et al.* 2010; Flemming and Wingender 2010; Henche *et al.* 2012; Korea *et al.* 2010; Pratt and Kolter 1998; Reisner *et al.* 2003). Ainsi, dans Manetti *et al.* 2007, il est par exemple dit que les bactéries *Streptococcus pyogenes* dont le gène codant pour la synthèse des pili-F a été supprimé ne parviennent pas à synthétiser une structure tridimensionnelle.

Les protéines surfaciques :

Elles recouvrent la membrane externe de la bactérie et lient la surface bactérienne et les EPS. Dans cette thèse deux types de protéines surfaciques ont été considérés :

- **La protéine Ag43** qui est une protéine adhésive produite grâce à l'antigène 43 et qui a comme particularités d'être auto-associative et auto-transporteuse, ce qui signifie qu'elle peut se transporter jusqu'à la surface cellulaire sans l'aide d'autres systèmes de transport, et qu'elle interagit avec elle-même (Jacquot *et al.* 2014). Elle participe ainsi à l'auto-agrégation du biofilm, c'est-à-dire que des amas de bactéries se forment grâce à cette protéine (Trunk *et al.* 2018). Elle est constituée de deux différents polypeptides et forme une structure rigide de 10 nm d'épaisseur (Beloin *et al.* 2010; Caffrey and Owen 1989; Francius *et al.* 2011; Reisner *et al.* 2003).
- **La protéine YeeJ**, située à la surface de la bactérie, qui permet potentiellement aux bactéries dont elle est issue de s'attacher sur des cellules cibles. Elle promeut l'adhésion des biofilms sur des surfaces abiotiques. La valeur de sa masse moléculaire est de 244 kDa, son rayon est de

l'ordre de quelques nanomètres et son point isoélectrique est de 4,79 (Martinez-Gil *et al.* 2017).

Les flagelles :

Les flagelles sont des filaments protéiques hélicoïdaux, d'une épaisseur de l'ordre de 20 nm, responsables de la motilité des bactéries et de leur propagation dans le milieu, ainsi que de la connexion cellules-cellules. Ils interviennent également dans l'attachement initial de la cellule (Flemming and Wingender 2010).

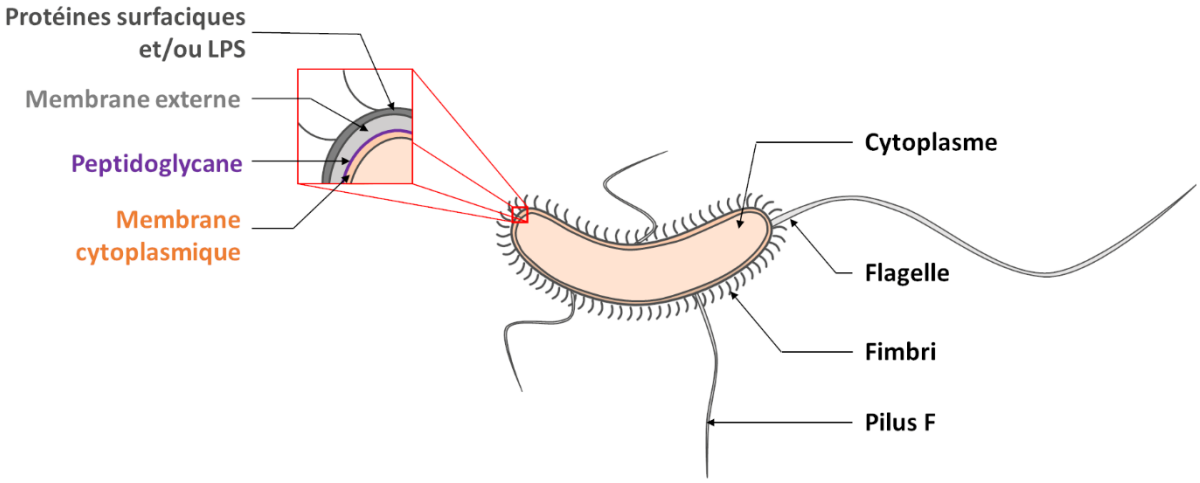


Figure 9 : Représentation schématique des appendices de surface d'une bactérie à Gram-négatif et de la composition de sa paroi cellulaire.

2.4 La diffusion de particules dans les biofilms

La diffusion représente le procédé prédominant de pénétration d'agents extérieurs à l'intérieur du biofilm. En effet, la structure d'un biofilm est hétérogène, et différents canaux, crevasses ou pores, de tailles variables, sont présents en son sein. C'est cette hétérogénéité qui peut permettre aux fluides ou aux particules de pénétrer et de diffuser dans la matrice du biofilm (Bryers and Drummond 1998; Stewart and Franklin 2008; Zhang *et al.* 2011).

Dans le cas des NPs, la mesure de leur coefficient de diffusion à l'aide de la spectroscopie de corrélation par fluorescence (SCF) a montré qu'elles se répandent à une vitesse variable et dans une quantité qui diffère selon *e.g.* la structure du biofilm, l'accumulation locale des NPs par les structures polysaccharidiques, les macromolécules et les cellules, la taille des NPs et leur composition chimique (Peulen and Wilkinson 2011; Stewart 2003). Plutôt que l'agrégation des NPs à la surface du biofilm, il a ainsi été montré que la viscosité et l'irrégularité structurale du biofilm sont les deux principaux facteurs limitants de la diffusion de ces NPs à l'intérieur du biofilm (Guiot *et al.* 2002; Mah and O'Toole 2001; Peulen and Wilkinson 2011; Stewart 2003). Dans Guiot *et al.* 2002, deux biofilms issus de souches

présentant une teneur différente en EPS sont observés par MEB (**Figure 10**). Une comparaison du coefficient de diffusion de NPs anioniques fluorescentes, au sein de ces biofilms ayant une teneur différente en EPS, est faite. Il s'avère que, du fait d'un encombrement stérique dû à la présence des EPS de la matrice du biofilm, le coefficient de diffusion de ces NPs est 50 fois inférieur à celui de ces même NPs évoluant dans un milieu de bactéries planctoniques.

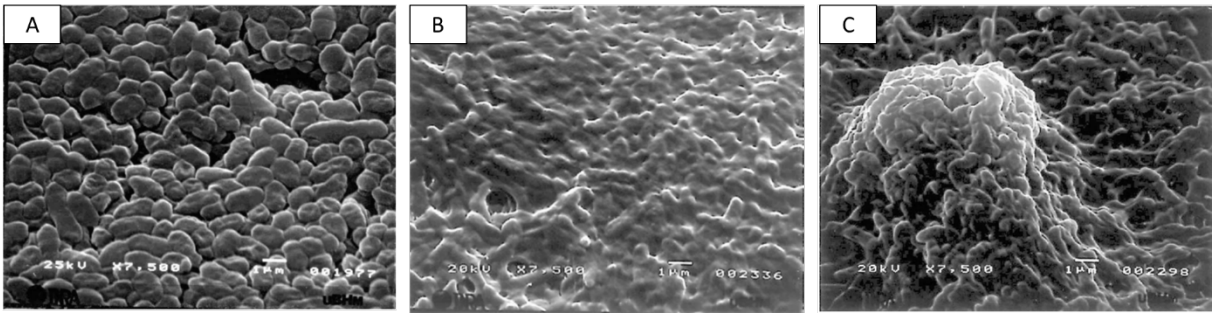


Figure 10 : Images par MEB de biofilms bactériens, A : Biofilm produisant peu d'EPS, B et C : Biofilm produisant davantage d'EPS et C avec l'apparition de structure en forme champignon. D'après Guiot *et al.* 2002.

De plus, dans Peulen and Wilkinson 2011, il est montré que le coefficient de diffusion de NPs d'argent, dans des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*, décroit avec l'augmentation de la taille des NPs, comme attendu du fait de la relation de Stokes-Einstein (Liu *et al.* 2008). Des conclusions similaires ont été observées lors de l'étude de la répartition de sondes fluorescentes au sein d'un biofilm. En outre, (Zhang *et al.* 2011) confirme que, comme attendu, plus la taille des sondes est importante, plus leur coefficient de diffusion au travers d'un biofilm diminue. Il est à noter que, dans cette même étude, la force ionique ou le pH du biofilm n'ont semblé avoir aucun effet sur la diffusion de ces sondes au sein du biofilm.

Dans (Bryers and Drummond 1998) il a été montré que des macromolécules, à poids moléculaires égal, n'ont pas le même coefficient de diffusion au sein d'un biofilm. Cela est probablement à la forme de ces macromolécules, ou à des interactions électrostatiques attractives entrainant la liaison d'une de ces macromolécules à la matrice extracellulaire du biofilm. Par ailleurs, des forces électrostatiques répulsives semblent exister entre des NPs chargées négativement et les EPS, eux aussi portant une charge négative (Guiot *et al.* 2002). Ces NPs présentent alors un faible coefficient de diffusion dans le biofilm (Guiot *et al.* 2002; Peulen and Wilkinson 2011). De même, les effets hydrophobes influent sur la diffusion des NPs dans les biofilms. Ainsi, en comparant des biofilms composés de bactéries arborant des protéines surfaciques hydrophobes ou hydrophiles, il est apparu par l'utilisation de la SCF que la fraction de NPs de polystyrène, présentant des groupements carboxylates, diffusant à travers le biofilm est moindre lorsque la surface des bactéries est hydrophobe (Habimana *et al.* 2011).

Enfin, les substances polymériques du biofilm sont également connues pour empêcher la diffusion des antibiotiques (Costerton *et al.* 1999; Gordon *et al.* 1988), même s'il a été prouvé que, malgré ces EPS, des particules virales ou des bactériophages parviennent à diffuser dans les biofilms ou autres structures poreuses (Briandet *et al.* 2008; Lacroix-Gueu *et al.* 2005).

III. Les facteurs d'interactions NPs/cellules

Différents facteurs peuvent favoriser l'interaction entre NPs et cellules vivantes. Ici une attention particulière est portée sur les bactéries car elles sont l'objet de recherche de cette thèse. Par ailleurs, des études ont été menées concernant la répartition et la diffusion des NPs dans les biofilms. En effet, la structure du biofilm mais également les interactions (*e.g.* électrostatiques, stériques, van der Waals, hydrophobes) entre NPs et bactéries régissent la position des NPs au sein des biofilms.

1. Les appendices et biomolécules de surface des bactéries

Les principaux types de groupements surfaciques bactériens influencent très nettement les interactions des cellules bactériennes avec les NPs. Ainsi, dans Beaussart *et al.* 2016, des fullerènes, fonctionnalisés par de multiples groupements de mannose, se lient aux groupes fonctionnels adhésifs FimH de pili type I de *E. coli* par le biais d'interactions protéines-carbohydrates. Ces interactions sont privilégiées par rapport à celles faisant intervenir des monomères de mannose, ce qui permet de mettre en avant une piste concernant l'utilisation d'agents antiadhésifs bloquant l'adhésion des pathogènes sur les tissus hôtes.

De plus, des interactions électrostatiques ont été décelées entre les LPS des membranes externes de bactéries à Gram négatif et des NPs d'or cationiques. Plus la teneur en LPS est élevée, plus l'association avec les NPs cationiques augmente. A l'inverse, aucune interaction n'est décelée avec des NPs anioniques (Jacobson *et al.* 2015). Par ailleurs, dans Abadeer *et al.* 2015, l'utilisation de la résonance des plasmons de surface localisée (LSPR) pour mesurer l'adsorption d'un matériau sur une surface métallique, ainsi que la mesure des indices de réfraction des NPs, après exposition aux différents types de bactéries, a permis de nuancer l'affinité des LPS, selon le type de bactérie dont ils sont issus, avec les NPs, selon le polymère fixé à leur surface.

En outre, dans Yang *et al.* 2015, il est démontré qu'il existe des interactions spécifiques entre les LPS et de QDs cationiques (dont les propriétés particulières sont mentionnées en **§ III.5**). Dans un premier temps, les interactions menant à la liaison des QDs à la paroi bactérienne semble être d'ordre électrostatique. En effet, pour des bactéries à Gram-positif, dont la paroi est composée de peptidoglycane, de protéines et d'acide téichoïque, les QDs se répartissent uniformément sur les sites liants. Cependant, les LPS, un des composants de la paroi des bactéries à Gram-négatif, semblent être responsables d'interactions spécifiques entrainant (i) l'agrégation des QDs et (ii) la diminution de la fluorescence induite par les QD (*fluorescence quenching)*.

2. La taille des NPs

L'importance de la taille des NPs dans la dégradation de la surface membranaire (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Shang *et al.* 2014), et dans la toxicité causée aux bactéries (Silva *et al.* 2014) est un des

facteurs régulièrement décrit dans différentes publications. Ainsi, dans la littérature, il est décrit que des NPs d'argent de 20 nm peuvent pénétrer dans la paroi de cellules intestinales humaines, alors que celles de 100 nm restent hors de la cellule (Beddoes *et al.* 2015; Verano-Braga *et al.* 2014). A ce titre, dans Mathelié-Guinlet *et al.* 2017, un diamètre critique des NPs de silice, reconnu comme étant celui où les NPs causent le plus de dommages à la paroi de bactéries *E. coli*, est déterminé par AFM comme étant compris entre 50 nm et 80 nm. Dans cet intervalle, les NPs se fixent à la surface de la bactérie ou entre deux cellules et elles sont enveloppées dans les sillons (« *ripples* » dans l'article) de la paroi bactérienne. Toujours dans Mathelié-Guinlet *et al.* 2017, en-dessous de 50 nm de diamètre, les NPs modifient l'organisation de la paroi externe des bactéries. Le contenu intracellulaire se répand et la forme première des bactéries est altérée, ces dernières pouvant aller jusqu'à devenir sphériques. Dans Guo *et al.* 2014, pour un diamètre de NPs de 65 nm, il a été constaté que la couche épaisse de peptidoglycane de la bactérie à Gram-positif *Bacillus subtilis* empêche des NPs de silice couvertes d'argent de pénétrer dans le cytoplasme. La paroi subit cependant des dommages car du matériel cellulaire s'enroule autour des NPs. A l'inverse pour une bactérie à Gram-négatif, *Vibrio natriegens*, les NPs pénètrent à l'intérieur du cytoplasme (**Figure 11**).

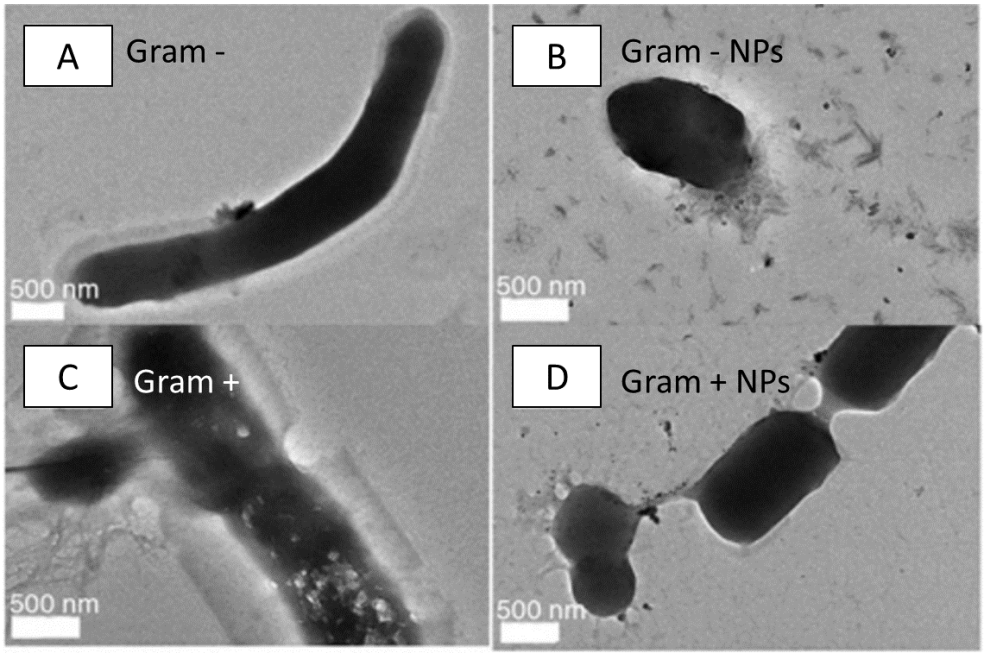


Figure 11 : Effet de NPs de Silice/polydopamine/argent sur des bactéries à Gram-négatif (*Vibrio natriegens*) et à Gram-positif (*Bacillus subtilis*). A : *Vibrio natriegens*, B : *Vibrio natriegens* + NPs, C : *Bacillus subtilis*, D : *Bacillus subtilis* + NPs. Extrait et adapté d'images obtenues par MET dans Guo *et al.* 2014.

Des tests de toxicité montrent par ailleurs que les NPs d'argent d'un diamètre inférieur à 10 nm induisent davantage la mort cellulaire que des NPs dont le diamètre est de plus de 50 nm (Silva *et al.* 2014).

Le critère de la taille peut se coupler à celui de la charge pour induire des interactions entre NPs et bactéries. En effet, dans Mathelié-Guinlet *et al.* 2017, pour des NPs de silice de diamètre supérieur à 100 nm chargées négativement, les parois bactériennes sont très peu altérées. A l'inverse, lorsque des NPs de taille équivalente sont chargées positivement, elles s'agglomèrent sur les parois bactériennes. L'influence de la charge sera plus amplement détaillée en **§ III.4**.

Par ailleurs, dans des conditions physico-chimiques où les forces attractives de van der Waals prévalent sur les forces électrostatiques de répulsions, des phénomènes d'agrégation des NPs se produisent au sein d'une solution colloïdale (Derjaguin and Landau 1993; Verwey and Overbeek 1948). Les NPs tendent à s'agréger facilement en solution aqueuse du fait de la compression de la DCE en présence de cations multivalents ou des conditions existantes au sein du biofilm impliquant une force ionique importante (Choi *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2009). La taille de ces agrégats influe grandement sur les interactions avec des objets voisins. Pour de larges agrégats, supérieurs à 400 nm, les NPs restent à la surface des bactéries (Pagnout *et al.* 2012), et l'abondance de faibles agrégats (d'une taille de l'ordre de 100 nm) induisent une toxicité plus importante des NPs (Planchon *et al.* 2013). En outre, l'étude de la diffusion des NPs dans des biofilms bactériens met en avant le fait que la taille des NPs influe grandement sur leur capacité à diffuser dans un biofilm. En effet, comme expliqué précédemment en **§ II.2.4**, le coefficient de diffusion des NPs au sein d'un biofilm diminue avec l'augmentation de la taille des NPs. Ainsi dans Peulen et Wilkinson 2011, il est mis en avant que des NPs d'un diamètre supérieur à 50 nm, pénètre difficilement dans les biofilms bactériens.

3. La forme des NPs

Les interactions objets / parois cellulaires diffèrent d'une particule à l'autre en fonction de leur forme. Cela se traduit, par exemple, par la constatation d'effets bactéricides accrus d'une forme de NPs à l'autre. Il apparait que des NPs triangulaires d'argent ont un effet bactéricide supérieur à des NPs sphériques ou cylindriques sur des bactéries *E. coli* (Pal *et al.* 2015). Par ailleurs, des NPs de forme cylindriques ont un effet antibactérien moindre que les sphériques (Nair *et al.* 2009; Simon-Deckers *et al.* 2009). Dans Chithrani *et al.* 2006, il est ainsi montré que des NPs sphériques en or, d'un diamètre inférieur à 100 nm, ont une probabilité supérieure de pénétrer à l'intérieur de la membrane des cellules de mammifères, par rapport à des NPs cylindriques d'une longueur de 74 nm et d'un rayon de 14 nm. En effet, via un procédé d'endocytose à récepteurs (ou *receptor-mediated endocytosis*), les ligands d'acide citrique à la surface des NPs se lieraient aux récepteurs protéiques de la cellule, ce qui

aurait pour conséquence une internalisation des NPs. Les raisons pouvant expliquant cette différence d'assimilation serait une surface spécifique de contact plus importante entre NPs cylindriques et cellule, ainsi qu'une répartition non homogène des ligands à la surface des NPs cylindriques.

4. La charge de surface

La charge de surface des NPs, comme des bactéries, constitue un des facteurs primordiaux d'interactions électrostatiques. Lors de la constatation de modifications importantes de la paroi cellulaire par le biais de l'AFM ou du MET, l'existence d'interactions électrostatiques attractives entre les NPs et les cellules est régulièrement mise en avant comme cause de ces modifications (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Miyazaki *et al.* 2014; Pagnout *et al.* 2012). Il est à noter que les bactéries sont chargées négativement, entre autres du fait de la quantité de groupements carboxyliques présents à leur surface, et de la dissociation de ceux-ci dans un milieu aqueux (Van Der Wal *et al.* 1997).

Dans le cas de la mise en contact des bactéries avec des NPs chargées négativement, deux comportements ont été observés. Soit aucune modification de la paroi ou de l'aspect général de la surface de la bactérie n'est à constater du fait de la mise en présence de NPs, pour des NPs de diamètre supérieur à 80 nm (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017). Soit, les NPs pénètrent dans la structure membranaire des bactéries malgré leurs charges négatives respectives (Sondi and Salopek-Sondi 2004). Dans ce cas d'autres facteurs d'interactions que ceux impliquant des interactions électrostatiques sont à prendre en compte.

Lorsque les NPs sont chargées positivement, en opposition à la charge de surface négative des bactéries, des « grappes » de bactéries se forment et sont constituées de NPs agrégées (Stoimenov *et al.* 2002), ou des NPs entourent la surface des bactéries (Pagnout *et al.* 2012). De même, des lésions semblables à des cratères, ou l'invagination de NPs dans les bactéries sont deux phénomènes qui peuvent être observés, et ce alors que le diamètre des NPs est important (> 100 nm) (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017). Les charges portées par les NPs influent également sur le coefficient de diffusion des NPs au sein d'un biofilm (***cf.* § II.2.4**).

En outre, les conditions du milieu modulent les interactions entre NPs et bactéries. Par exemple, dans le cas d'un pH acide, la protonation des groupements surfaciques des particules considérées entraine une augmentation de la quantité de charges positives à la surface de la particule. A l'inverse, lorsque le pH de la solution augmente, la déprotonation des groupes de surface diminue la quantité de protons à la surface de la particule entrainant une augmentation des charges négatives à la surface des particules (Moussa *et al.* 2015). Le pH peut également avoir des conséquences sur l'état physiologique de la bactérie et peut donc favoriser, ou non, des possibles modifications des parois bactériennes en présence de NPs (Planchon *et al.* 2013). Une corrélation a été établie entre la toxicité de NPs de TiO_2

et la charge de surface de ces NPs, évoluant selon le pH et la force ionique du milieu. Ainsi, à pH 5,5, les NPs présentent une charge de surface positive et se fixent sur la paroi des *E. coli* en s'agrégeant. A l'inverse, à pH 9,5, la charge de surface des NPs est négative et aucune modification structurale de la paroi bactérienne ou toxicité n'est à constater (Pagnout *et al.* 2012) (**Figure 12**).

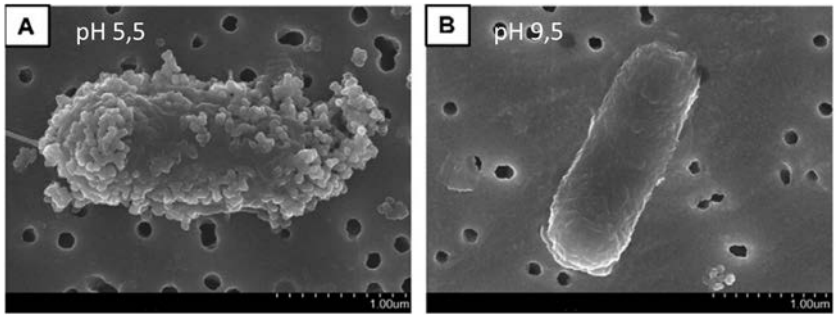


Figure 12 : Images obtenues par MEB d'*E. coli* exposées à des NPs TiO_2 à A : pH 5,5, B : pH 9,5. D'après Pagnout *et al.* 2012.

La force ionique d'une solution est un facteur qui influence de manière conséquente les interactions électrostatiques. Lorsque la force ionique du milieu augmente, les ions de l'électrolyte écrantent les charges de surfaces des particules en solution et les interactions électrostatiques sont limitées. Ainsi, par exemple dans Pagnout *et al.* 2012, il est montré que dans le cas où des NPs de TiO_2 et des bactéries *E. coli* sont mises en solution, une force ionique faible facilite les interactions électrostatiques attractives entre bactéries et NPs lorsque les charges sont opposées, et à l'inverse une force ionique élevée les empêche. Ce phénomène est également constaté lors de l'exposition de levures à des NPs de latex (Miyazaki *et al.* 2014). Le type d'ions en solutions peut également être un facteur favorisant les interactions électrostatiques (Pagnout *et al.* 2012).

En outre, les EPS excrétées par les bactéries dans le milieu, ainsi que les composants des cellules mortes ou détruites, peuvent interagir avec les NPs, avant que ces dernières n'interagissent avec les bactéries vivantes (Neal 2008; Thill *et al.* 2006; Zeyons *et al.* 2009). Ainsi, dans Sondi et Salopek-Sondi 2004, il apparaît que la croissance bactérienne est stoppée lorsque les bactéries *E. coli* sont en présence de NPs d'argent et que le milieu a été rincé, alors que cette croissance n'est que ralentie lorsque les EPS et les cellules mortes demeurent dans le milieu.

Par ailleurs, des processus biotiques peuvent mener les NPs à acquérir une bio-couronne à leur surface, ce qui amène une modification de leur charge surfacique. Cette couronne est composée de molécules organiques, *e.g.* des protéines (Fleischer and Payne 2014; Lundqvist *et al.* 2008; Monopoli *et al.* 2012), qui se sont associées aux NPs. Il est possible de penser que cela peut avoir d'importantes répercussions sur les interactions NPs-biofilms. Par exemple, dans Morrow *et al.* 2010, les QDs recouverts de

molécules organiques (polyéthylène glycol) se sont avérés pénétrer plus facilement dans des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* que les QDs arborant des groupements carboxyliques.

5. Le type de NPs

Certains types de NPs sont étudiés pour leur application dans les domaines médicaux du fait du caractère antibactérien du métal qui les composent : argent, zinc, or, cuivre, magnésium (Stoimenov *et al.* 2002; Vidic 2013). Par exemple, les NPs d'argent interagissent avec la paroi des bactéries, pénètrent à l'intérieur de la cellule et s'accumulent en entrainant la mort de la cellule. Cependant, le caractère antibactérien de ces NPs d'argent provient d'avantage des ions libérés par ces NPs au contact d'un milieu liquide, que des NPs. La dissolution et la dissémination de ces ions ont pour conséquence des modifications des procédés métaboliques. De plus, ces ions interagissent avec la paroi des bactéries et modifient leur intégrité, ce qui se traduit par l'apparition notamment de trous ou de cavités (Choi *et al.* 2010; Singh *et al.* 2012; Sondi and Salopek-Sondi 2004; Stoimenov *et al.* 2002).

Les NPs sont également fréquemment fonctionnalisées avec des groupements spécifiques (*e.g.* hydrophobes, chargés négativement, positivement) afin de cibler des récepteurs particuliers à la surface des cellules et de renseigner sur les propriétés physico-chimiques des bactéries (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018; Paschkunova-Martic *et al.* 2005; Tan *et al.* 2004) en tant que marqueurs fluorescents ou dans le cadre du développement de biocapteurs (Chen *et al.* 2015; Tran *et al.* 2013). Par exemple, des NPs d'or hydrophobes fonctionnalisées peuvent être utilisées pour identifier les bactéries en se fixant à leur surface. Les parties hydrophobes des NPs interagissent avec les régions hydrophobes de la bactérie (Hayden *et al.* 2012; Phillips *et al.* 2008). Les NPs de latex ou de silice sont souvent utilisées en étant fonctionnalisées, leur avantage principal étant la facilité de modifier leur surface (Pham *et al.* 2012; Tan *et al.* 2004; Wang *et al.* 2015). Par exemple, la modification de certains paramètres dans le protocole de Stöber (mentionné dans le **chapitre 2 § I.2**) permet de moduler le diamètre des NPs de silice synthétisées (Tan *et al.* 2004). Ainsi, les NPs de silice ont par exemple été fonctionnalisées par des groupements argent dans le but d'appréhender l'effet de ce métal sur des parois de bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif (Guo *et al.* 2014). Elles sont également régulièrement fonctionnalisées avec des sondes fluorescentes, afin de marquer des bactéries *E. coli* pour aider à la bio-imagerie par fluorescence (Pham *et al.* 2012; Tan *et al.* 2004). De plus, cette facilité à modifier la surface de ces NPs font d'elles des candidates prometteuses pour la vectorisation de médicament (Wang *et al.* 2015). Elles ont par exemple été utilisées pour répandre du monoxyde d'azote (NO) au sein de biofilms de différentes souches bactériennes dans le but de les détruire (Hetrick *et al.* 2009).

En outre, à partir d'une certaine taille, et en fonction de la charge des groupes de surfaces qui leur sont greffés, ces NPs peuvent recouvrir entièrement la surface membranaire des cellules et causer leur mort du fait (i) d'une rupture de la membrane, et par conséquent d'une fuite de liquide intracellulaire, (ii) de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ou *reactive oxygen species* soit ROS), responsables de l'altération de constituants de la bactéries (Fruijtier-Pölloth 2012; Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Miyazaki *et al.* 2014).

D'autres NPs régulièrement étudiées sont les NPs de TiO_2. En effet, elles sont très utilisées par exemple dans l'industrie agroalimentaire (Weir *et al.* 2012). Il a été mis en évidence que ces NPs ont tendance à s'agréger et qu'elles interagissent avec la paroi des bactéries selon les conditions de pH et de salinité du milieu (Pagnout *et al.* 2012; Planchon *et al.* 2013).

Concernant les QDs, des nanocristaux semiconducteurs, ils sont très utilisés en tant que sonde dans des applications de bio-imagerie, pour le marquage moléculaire et dans l'élaboration de biocapteurs du fait de leur propriétés optiques, *i.e.* un large spectre d'excitation et un spectre d'émission étroit, et de leur importante stabilité photochimique (Barroso 2011; Michalet *et al.* 2005). Ainsi, il a par exemple été mis en avant dans (Abdelhamid and Wu 2013), par l'utilisation de QDs fonctionnalisés avec des groupements de polysaccharides, que les interactions entre les polysaccharides et les parois bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphyloccocus aureus* s'ont d'ordre hydrophobes et électrostatiques. Dans Aldeek *et al.* 2011, les QDs sont fonctionnalisés avec des groupements hydrophiles afin de localiser les microdomaines hydrophobes au sein de biofilms de *Shewanella oneidensis.*

Enfin, les dendrimères sont également utilisés, par exemple en tant que biocide capables de dénaturer les protéines des membranes et de pénétrer dans la cellule (Chen and Cooper 2002).

6. La concentration en NPs

Il n'est pas possible de déterminer précisément une valeur de concentration de NPs commune à partir de laquelle des effets néfastes sont constatés sur l'ensemble des bactéries existantes. En effet, un trop grand nombre de paramètres régissent les interactions entre NPs et bactéries. Néanmoins, afin de déterminer un ordre de grandeur dans lequel la quantité de NPs entraine des interactions avec les bactéries, et potentiellement une toxicité, plusieurs exemples sont présentés.

Dans Brayner *et al.* 2006, il a été montré que plus la concentration en NPs de zinc est élevée, sur une gamme de 10^{-3} à 10^{-2} mol.L^{-1}, plus le nombre de colonies bactériennes *E. coli* diminuent. En effet, pour une concentration de l'ordre de 1×10^{-3} mol.L^{-1} en NPs, aucun dommage n'est observé sur les parois bactériennes. A une concentration de 5×10^{-2} g.L^{-1}, il a été montré dans Sondi and Salopek-Sondi 2004

que les NPs d'argent pénètrent dans la structure membranaire des bactéries *E. coli*. Dans Guo *et al.* 2014, entre 0,28 $g.L^{-1}$ et 0,33 $g.L^{-1}$ de NPs de silice en solution, la densité optique de bactéries planctoniques diminue de 0,7 à 0,3. Enfin, dans Mathelié-Guinlet *et al.* 2017, avec une concentration de 1 $g.L^{-1}$, pour des NPs de silice chargées négativement de diamètre supérieur à 100 nm, les parois bactériennes sont très peu altérées, et lorsque les NPs sont chargées positivement elles s'agglomèrent sur la paroi des *E. coli*. A titre de comparaison, dans Gottschalk *et al.* 2013, il est dit que la concentration estimée de NPs de TiO_2 dans les eaux de surface est comprise entre 10^{-3} et 10 $\mu g.L^{-1}$ et entre 1 et 10^3 $\mu g.L^{-1}$ dans les eaux usées d'une station d'épuration.

IV. Les techniques d'analyse

Selon l'échelle d'étude considérée, différents moyens de détection existent pour appréhender, comprendre et identifier les interactions entre deux types de particules. Ainsi, des méthodes comme l'électrophorèse permettent d'accéder aux propriétés physico-chimiques des particules à l'échelle de la solution, tandis que les techniques de microscopie avec et sans marquage rendent compte des conséquences des interactions attractives entre NPs et bactéries sur la morphologie de ces dernières et sur la structure des biofilms.

1. Les techniques de détection en solution

1.1 Le titrage protolytique

Elle permet de déterminer la charge de surface de colloïdes biotiques ou abiotiques. Pour les NPs cette technique est efficace. Cependant, pour les bactéries, il est compliqué de déterminer si les protons proviennent de la paroi des bactéries ou s'ils sont excrétés ou assimilés par les cellules du fait de processus métaboliques (*e.g.* respiration) (Van Der Wal *et al.* 1997).

1.2 L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de caractérisation des propriétés électrostatiques des colloïdes. Les particules en solution à l'intérieur d'un capillaire sont soumises à un champ électrique et leurs déplacements sont suivis par un laser couplé à une caméra. A partir des déplacements des particules est évaluée leur mobilité électrophorétique. Le principe de fonctionnement est présenté plus en détails dans le **chapitre 2 § IV.1.** Ainsi, l'électrophorèse est utilisée pour déterminer la charge de surface des particules dures (Åkesson *et al.* 2012; Li *et al.* 2010; López-Viota *et al.* 2009) et les charges volumiques des particules molles *e.g.* les bactéries (Dague *et al.* 2006; Duval and Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Gaboriaud *et al.* 2006). Ainsi, la mobilité électrophorétique de la densité de charges portée par les particules, mais aussi de leur distribution spatiale dans des directions parallèles et perpendiculaires à l'interface qu'elles forment avec le milieu, de leur dimension, et de la densité et la longueur de leurs structures polymériques surfaciques si existantes (Duval and Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Francius *et al.* 2011; Hill *et al.* 2003; Moussa *et al.* 2015; Ohshima 1995). La concentration en solution influe également, ainsi que la composition chimique du milieu de dispersion des particules, ce qui implique le pH, le type d'électrolyte et la force ionique (Duval and Gaboriaud 2010; López-León *et al.* 2005; Maurya *et al.* 2018; Ohshima 1995; Pagnout *et al.* 2012).

A partir des valeurs de mobilité électrophorétique obtenues, une piste de compréhension des interactions entre NPs et bactéries peut être mise en exergue. Par exemple, il est mis en évidence qu'une barrière électrostatique se forme entre des bactéries chargées négativement et des NPs également négatives, du fait de forces électrostatiques répulsives. Si les NPs deviennent positives, du

fait de changement des conditions du milieu, la barrière électrostatique est franchie (El Badawy *et al.* 2011). Il s'agit d'une des raisons expliquant les interactions attractives entre bactéries et NPs (Stoimenov *et al.* 2002).

En outre, l'électrophorèse permet d'étudier la dépendance du comportement électrostatique des bactéries ou des NPs à la composition physico-chimique du milieu *e.g.* le pH, la force ionique et le type d'ions en solution (Gaboriaud *et al.* 2006; López-León *et al.* 2005; Pagnout *et al.* 2012). De plus, il est possible de mettre en relation le comportement électrostatique des bactéries avec leur type de biostructure surfacique et la densité de leur couche polymérique de surface (Beaussart *et al.* 2018a; Dague *et al.* 2006; Duval and Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Francius *et al.* 2011; Sonohara *et al.* 1995). Par exemple dans Francius *et al.* 2011, il est mis en avant que la mobilité électrophorétique μ est différente selon les appendices surfaciques des bactéries. Ainsi, à pH 6,6 sur une gamme de force ionique allant de 1 à 100 mM, sont étudiées 4 souches *E. coli* présentant sélectivement des fimbriae, des pili-F, une protéine de surface Ag43 et aucune biostructure pariétale (souche nue). Les valeurs de $|\mu|$ les plus élevées sont atteintes par la souche nue. Les différences de μ entre chaque souche résultent notamment des propriétés électrostatiques de surface des bactéries ainsi que des forces de trainée des cellules selon les appendices de surface qu'elles présentent. Plus de détails sont fournis dans Francius *et al.* 2011, ainsi que dans le **chapitre 3** de cette thèse. Il est également constaté qu'une augmentation de la force ionique du milieu entraine une diminution de $|\mu|$ quel que soit les biostructures pariétales des bactéries. En effet, pour des valeurs élevées de force ionique, les charges portées par les enveloppes bactériennes sont écrantées par les ions de l'électrolyte dans lequel elles sont suspendues, entrainant ainsi une diminution de $|\mu|$ (Duval and Gaboriaud 2010; Francius *et al.* 2011). L'électrophorèse permet également de déterminer si plusieurs populations évoluent au sein d'un même milieu *e.g.* deux populations bactériennes ou des bactéries et les substances qu'elles excrètent (Dague 2006).

Des modèles physiques analytiques ont été déployés afin, à partir de la mobilité électrophorétique, d'accéder aux propriétés électrostatiques des particules. Dans le cas des particules dures sphériques, des modèles existent pour reconstruire la mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en sels du milieu et du potentiel zêta, comme par exemple celui de O'Brien et White (O'Brien and White 1978).

Pour les particules molles, *e.g.* les bactéries *E. coli* et les NPs de silice considérées dans cette thèse (Duval and Gaboriaud 2010; Škvarla 2007), la distribution ionique et la distribution du potentiel électrostatique dans l'environnement proche de la surface des particules est différente (***cf.* § II.2**). Les propriétés hydrodynamiques et la densité de charge volumique de la couche molle influence la mesure

de la mobilité électrophorétique. D'autres modèles doivent donc être utilisés pour atteindre la mobilité électrophorétique expérimentale comme le modèle d'Ohshima (Ohshima 1995) qui permet d'évaluer la densité volumique de charge ρ_0 (mol.m^{-3}) et la longueur de pénétration hydrodynamique du fluide dans la couche molle $1/\lambda_0$ (m) (**Figure 13**). Les conditions d'application de ce modèle sont détaillées dans le **chapitre 3.**

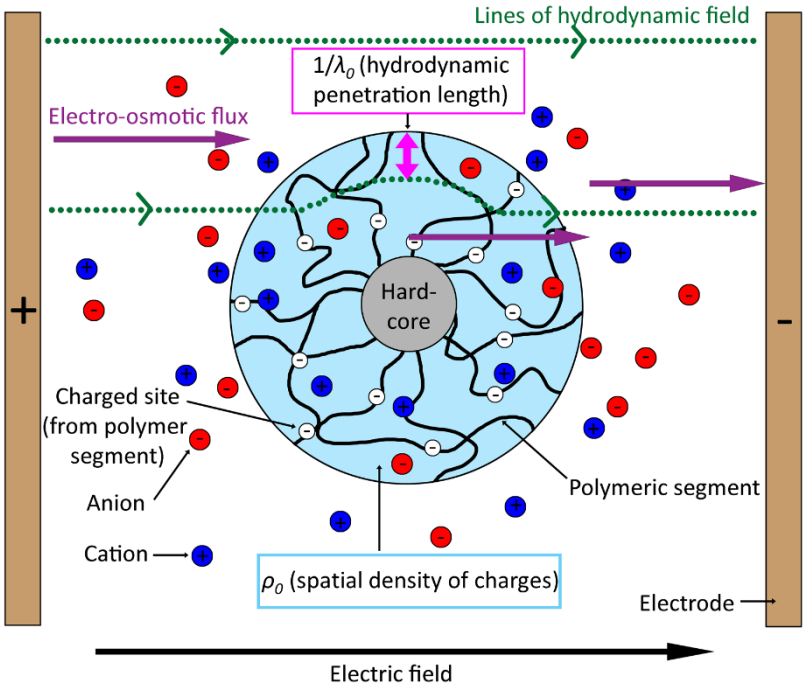


Figure 13 : Représentation schématique d'une particule molle soumise à un champ électrique avec l'application du modèle d'Ohshima permettant la détermination des paramètres ρ_0 et $1/\lambda_0$.

Le modèle de Duval-Ohshima permet d'obtenir également un paramètre α d'hétérogénéité de distribution de charge et de matériel membranaire perméable (Duval and Ohshima 2006; Francius *et al.* 2011).

1.3 Les méthodes à rayons X

Les analyses de composition à rayon X permettent de déterminer la composition chimique des objets analysés. A ce titre, l'analyse dispersive en énergie (EDXS) peut être utilisée pour déterminer la composition chimique qualitative des parois bactériennes, avant et après leur mise en contact avec des NPs. Cela permet de déterminer si les NPs métalliques, ou les ions issus de ces NPs, se sont intégrés à la paroi bactérienne (Morones *et al.* 2005; Sondi and Salopek-Sondi 2004). Des techniques d'absorption des rayons X (XANES) ou de spectroscopie des photoélectrons induits par rayons X (XPS) rendent compte de phénomènes d'oxydoréduction des NPs au contact des bactéries (Thill *et al.* 2006; Zeyons *et al.* 2009).

2. Les techniques d'imagerie

2.1 Avec marquage

2.1.1 Les microscopies de fluorescence et confocale

Un laser d'une longueur d'onde donnée excite les fluorochromes de l'échantillon qui, en réponse, émettent par fluorescence. Lorsque des photons arrivent au contact d'une molécule fluorescente, l'excitation électronique qu'elle subit a pour conséquence son changement de niveau d'énergie. Par la suite, la molécule se désexcite en émettant un photon. De ce fait, la fluorescence est émise à une longueur d'onde plus grande et une énergie plus basse que la lumière absorbée.

Pour la **microscopie à fluorescence**, l'ensemble de l'échantillon est éclairé uniformément, ce qui signifie que toutes les parties de l'échantillon sont excitées au même instant. Tout le champ optique est donc détecté par le photodétecteur ou la caméra, ce qui inclue l'arrière-plan (*background*) non focalisé. La microscopie à fluorescence est ainsi souvent utilisée comme première approche, ou en complément d'observations au MEB (Briandet *et al.* 2008), au MET ou à l'AFM (Stoimenov *et al.* 2002).

Dans la majorité des cas, l'utilisation d'un **microscope à fluorescence confocal** est plus indiquée. En effet, un microscope confocal utilise une illumination ponctuelle à travers un sténopé (ou *pinhole*) situé devant le détecteur, dans un plan confocal conjugué au plan de l'objectif (on parle alors de plans confocaux), pour éliminer le signal lumineux de l'arrière-plan. Seule la lumière très proche du plan focal est détectée (**Figure 14**). Ainsi cet appareil est utilisé pour passer au-delà des limitations des microscopes à fluorescence traditionnels. De plus, il s'agit d'une des technologies les plus performantes et pertinentes pour, d'une part, obtenir des informations sur la distribution spatiale des nanoparticules et des bactéries dans des suspensions aqueuses, et d'autre part, observer les biofilms *in situ*. La microscopie à fluorescence confocale permet d'acquérir des images en volume, et de rendre compte de la structure des biofilms bactériens en quantifiant l'épaisseur, la proportion de surface couverte, la biomasse totale et la rugosité (Baudin *et al.* 2017). Cependant, du fait de de la restriction de lumière induite par le sténopé, l'intensité lumineuse du signal est moindre et nécessite des expositions longues, ce qui implique pour les objets observés des risques de photodommages (*photodamage*) ou photoblanchiment (*photobleaching*) décris plus loin.

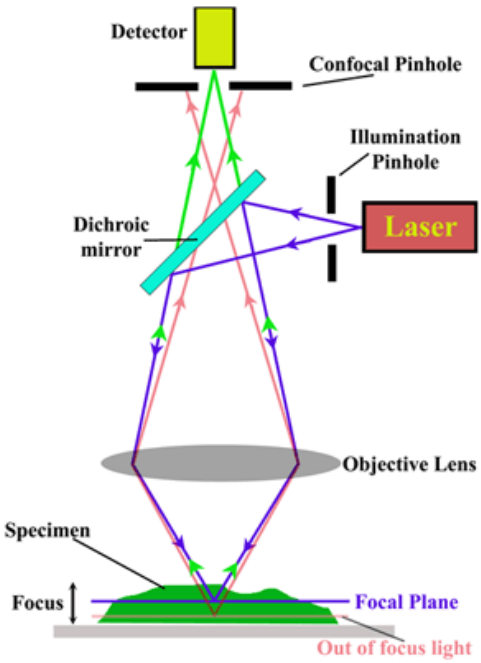


Figure 14 : Principe de la microscopie confocale (John Innes Centre, Confocal Microscopy, 2017)

L'utilisation de sondes fluorescentes, avec des spécificités moléculaires propres, peut s'avérer nécessaire pour (i) cibler certains types de molécules, (ii) visualiser efficacement, avec un important contraste, les cibles spécifiques dans les cellules et tissus, et (iii) identifier les propriétés physiques et chimiques des objets observés (**Figure 15**). Ainsi, la Concanavaline A (ConA) par exemple, est utilisée comme marqueur du mannose, un des constituants des matrices de biofilms bactériens (Baird *et al.* 2012; Johnsen *et al.* 2000). En outre, l'utilisation combinée de la ConA et du Syto9, marquant les acides nucléiques contenus dans les bactéries, permet ainsi de visualiser la position des bactéries au sein de la matrice du biofilm (Strathmann *et al.* 2002). Cependant, ces sondes peuvent causer des modifications de la surface et de la morphologie des objets observés. Elles nécessitent d'être sélectionnées selon le type de système à observer et la technologie disponible. De plus, l'utilisation de ces sondes peut affecter la physiologie intrinsèque de la cellule (Kim *et al.* 2017), et il convient de vérifier que celles-ci restent fixées aux objets dédiés et ne se répandent pas dans le milieu de l'échantillon. Il existe également la possibilité de modifier génétiquement les objets à observer afin qu'ils expriment une fluorescence. Une des modifications les plus connues est l'expression par les bactéries de la *Green Fluorescence Protein* (GFP) (Shimomura 1979; Tsien 2018).

Equipment	Material	Specificity		
Laser scanning microscope		An inverted microscope is preferred to *in situ* observations. Objectives with numerical aperture between 0.8 and 1.4 for adequate resolution of single cell scale observations. Different lasers for simultaneous multispectral excitation (UV laser, 405 nm), multiline argon laser (458, 476, 488, 496, and 514 nm), helium–neon lasers (543 or 633 nm).		
Biofilm devices compatible with LSM		Microscope slide, LSM dedicated microtiter plate (static growth) or flow cell (dynamic growth)		
	Fluorescent markers	Nucleic acid markers	Syto® nucleic acid stains, DAPI, Acridine orange	Nucleic acids. Total cell dying, visualization of biofilm architecture.
			Propidium iodide, Sytox® dead cell stains	Nucleic acids. Only penetrate in cells with compromised membranes. Membrane integrity indicators.
		Lipophilic markers	FM® lipophilic styryl dyes	Cytoplasmic membrane and vesiculation dying.
		Enzymatic markers	CTC, XTT	Cleaved in fluorescent residue by cellular dehydrogenases. Dying of respiratory active cells.
			CFDA, Calcein-AM, Chemchrome V6®	Cleaved in fluorescent residue by cellular esterases. Dying of esterasic active cells.
		Amine markers	Amine-, thiol-reactive probes	Amine or thiol residues. Identification of extracellular or external membrane associated proteins.
		Amyloid protein markers	Thioflavine S	Identification of amyloid protein fibers.
		Lectins	ConA, WGA, PNA	Identification of carbohydrates of the extracellular matrix.
		Fluorescent proteins	Green Fluorescent Protein (GFP) and its derivatives (RFP, CFP, YFP), mCherry	Constitutive expression by cells or associated with the expression of specific genes (reporter fusion). Enable the nondestructive 4D monitoring of biofilm development or visualization of specific genes expression in the three-dimensional structure over time.
		Fluorescently labelled antibodies		Identification of species or specific components.
		Fluorescently labelled oligonucleotide probes		Recombination with specific targeted gene sequence. Identification of species.
Data processing software		3D reconstruction software: IMARIS® (Bitplane), AMIRA® (Visage Imaging), ImageJ Quantification of biofilm structure: COMSTAT, PHLIP, ISA3D, DAIME		

DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole; CTC: 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium; XTT: 2,3-bis(2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide; CFDA: carboxyfluorescein diacetate; ConA: Concanavalin A; WGA: wheat germ agglutinin; PNA: peanut agglutinin

UNCORRECTED PROOFS

Figure 15 : Marqueurs fluorescents pour la détection des constituants des bactéries et des biofilms par microscopie à fluorescence (Bridier *et al.* 2014).

Parmi les inconvénients de l'observation par microscopie à fluorescence, il existe le phénomène de photoblanchiment. Il s'agit d'une altération photochimique irréversible qui rend un fluorophore incapable d'émettre un signal lumineux. Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée sur une période trop importante, lors de la transition entre l'état singulet et l'état triplet, les fluorophores peuvent interagir avec une autre molécule et créer des liaisons covalentes irréversibles. Ce phénomène rend impossible des observations sur une longue durée.

Outre les marqueurs fluorescents « classiques », des NPs, dont la structure a été modifiée (Ribeiro *et al.* 2014) sont utilisées de plus en plus régulièrement en tant que sondes fluorescentes, par exemple sous forme de QDs (Pinaud *et al.* 2011; Rizvi *et al.* 2010; Smith *et al.* 2008; Yang *et al.* 2015). Ainsi, dans Fleischer and Payne 2014, des NPs fluorescentes fonctionnalisées par des groupements amines ou carboxyles, décorées ou non de protéines, sont mises en contact avec des cellules épithéliales, dont les acide nucléiques ont été marqués avec une molécule fluorescente appelée DAPI. Il a ainsi été montré que la liaison de NPs anioniques sur les cellules est empêchée par les protéines décorant les NPs, alors que le comportement inverse est constaté pour des NPs cationiques. En outre, l'observation de bactéries sporulées, *Bacillus subtilis*, marquées par de la fluorescéine, fixée préalablement sur des NPs positives MgO, a prouvé que les spores bactériennes se couvrent de NPs. Par ailleurs, des agrégats

de NPs et de bactéries coagulées entre elles se forment du fait d'interactions électrostatiques, conclusion faîte après mise en parallèle avec des mesures de mobilité électrophorétique (Stoimenov *et al.* 2002). Les NPs chargées négativement, elles, n'adhérent pas à la surface des bactéries ou des cellules dont la surface est chargée négativement (Miyazaki *et al.* 2014; Nomura *et al.* 2013). Ainsi, l'utilisation de techniques de microscopie à fluorescence permet d'observer l'agrégation des NPs sur des couches lipidiques, la fixation des NPs sur des membranes cellulaires (Faye *et al.* 2013) et la destruction des bactéries au sein des biofilms du fait de leur contact avec des NPs (Radzig *et al.* 2013). La microscopie à fluorescence peut également être couplée à de kits de coloration *Live/Dead cells* afin de déterminer la proportion de bactéries mortes après mise en contact avec des NPs (Chávez de Paz *et al.* 2011; Pagnout *et al.* 2012; Shi *et al.* 2006).

Au sein des biofilms, la distribution spatiale de NPs selon leurs caractéristiques peut être observée (Choi *et al.* 2010). Il est également possible de déterminer la capacité des NPs à s'adsorber sur les biofilms en fonction de leurs groupements surfaciques (Nevius *et al.* 2012). Par ailleurs, les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale peuvent être combinées avec des images obtenues au microscope à 2 photons, où deux photons ayant chacun la moitié de l'énergie nécessaire à l'excitation d'un fluorophore sont absorbés quasi-simultanément. La microscopie d'excitation à deux photons permet une diffusion moindre de la lumière d'excitation et ainsi d'observer des volumes de l'ordre du femtolitre avec un très faible bruit de fond, tout en limitant le *photobleaching* au volume d'excitation. Les NPs sont ainsi détectées avec une meilleure résolution au sein de l'échantillon. Il est à noter que dans le cas de bactéries GFP, la diminution progressive de leur fluorescence avec la profondeur du biofilm peut être constatée du fait probablement de leur manque de contact avec l'oxygène, nécessaire à leur développement. Cette fluorescence peut également être altérée par l'activité antimicrobienne de certaines NPs (Choi *et al.* 2010).

Enfin, la diffusion des NPs au sein d'un biofilm, à partir de de l'observation sur un intervalle de temps dans une zone délimitée, peut être étudiée grâce à la microscopie à fluorescence confocale, par le biais de techniques de quantification de l'évolution de l'intensité du signal de fluorescence (Baudin *et al.* 2017) et de la spectroscopie de corrélation par fluorescence (Briandet *et al.* 2008).

2.1.2 Les techniques de microscopie à super résolution

La plupart des NPs ont une taille inférieure à la limite de résolution d'un microscope confocal classique (*ca.* 0,2 µm), qui est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière. Ainsi, Ernst Abbe a déterminé que la limite de résolution d_{res} (m) (**Equation 2**) d'un microscope est telle que :

$$d_{res} = \frac{\lambda}{2NA} \quad \textbf{(2)}$$

, λ : la longueur d'onde d'illumination (m), NA : l'ouverture numérique de l'objectif. Ainsi, la limite de résolution correspond à la distance limite à partir de laquelle deux points observés ne pourront plus être distingués l'un de l'autre (Abbe 1873; Stelzer 2002). Des techniques de super-résolution ont été développées pour pallier cette limite (Coltharp and Xiao 2012; Stephens and Allan 2003). Elles permettent de mettre en avant des détails non visibles avec la microscopie à fluorescence « classique ». Plusieurs de ces techniques sont mentionnées ici :

- La **microscopie par localisation photoactivée (PALM) et la microscopie par reconstruction stochastique optique (STORM)** qui reposent sur l'utilisation de fluorophores photoactivable et photocommutable. Un seul fluorophore fluoresce à chaque fois et les positions de chaque fluorophore sont ensuite superposées. Il est ainsi possible d'investiguer les interactions protéines-protéines ou protéines-ADN, en atteignant une résolution de 20 nm. Cette technique est limitée par le fait qu'une durée d'exposition longue des échantillons à la lumière d'excitation est nécessaire. De plus, les objets à observer doivent être fixes, entrainant l'utilisation d'agents fixateurs pouvant dénaturer l'échantillon.
- La **microscopie à illumination structurée (SIM)** : consiste à exciter les fluorochromes d'un échantillon avec des motifs d'illumination. Ces motifs de lumières sont constitués de structures fines, inférieures à la limite de diffraction. L'interférence entre le motif d'illumination et le motif des structures de l'échantillon produit des franges de Moiré. La combinaison de plusieurs de ces motifs obtenus sous différents angles d'illumination génère une image en haute résolution. La résolution latérale est de 50 nm. Cette technique de microscopie est utilisée pour investiguer des structures tridimensionnelles. Cependant, les images ne peuvent être observées qu'après une étape de déconvolution de chaque jeu de franges, ce qui entraine d'importants temps de calculs.
- La **microscopie de déplétion par émission stimulée (STED)** *:* un laser ajouté sur un microscope confocal stimule les molécules excitées jusqu'à l'état fondamental dans une région en forme de *donut* autour du point confocal central. Les molécules situées de 30 à 80 nm de ce point sont détectées. Le risque élevé de photoblanchiment est le principal inconvénient de cette technologie. Cependant, elle a pour avantage qu'une observation en temps réelle est possible, la rendant intéressante pour l'étude par exemple de la diffusion dans les biofilms.

2.2 Sans marquage

2.2.1 La microscopie photonique

Il s'agit de la microscopie classique. Un flux de photons est dévié par deux systèmes convergents, qui envoient par la suite une image agrandie. La **microscopie à fond clair** est utilisée pour des objets d'une taille de l'ordre du micromètre, comme les bactéries. Pour la **microscopie en champ sombre**, la lumière arrive latéralement sur l'objet et les particules capables de diffuser la lumière deviennent brillantes. Il est nécessaire que les cellules possèdent, dans leur cytoplasme, des structures avec un indice de réfraction élevé. De par la facilité de synthèse d'échantillon, les techniques de **microscopies photoniques à champ clair ou à champ sombre** sont utilisées en première approche, ou uniquement pour une vision globale de l'effet de NPs sur des bactéries (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017).

Les **microscopes à contraste de phase** exploitent les différences de phase entre les rayons lumineux de l'objet et un rayon lumineux de référence. La lumière traversant une région dense de l'échantillon est retardée par rapport à celle traversant une région moins dense. Ces microscopes génèrent des informations de haute intensité de contraste par interférences, créées par la recombinaison de ces deux ondes lumineuses. Ce type de microscopie est utilisé pour l'observation des structures internes des cellules et donnent des images en 2D permettant l'accès à la longueur, la largeur et la forme des objets observés (Davies *et al.* 1998; Kaback 1990).

2.2.2 La microscopie électronique

La microscopie électronique se base sur le fait que la longueur d'onde d'un électron est comprise entre 1 et 10^{-3} nm, ce qui permet d'atteindre une limite de résolution de l'ordre de l'angström.

Pour le **Microscope Electronique à Balayage (MEB)** l'image est formée par la réflexion des électrons par l'échantillon. Il permet d'avoir une profondeur de champ considérable et d'observer des objets en 3D à une résolution de 10 nm. La morphologie de surface des bactéries, et de ce fait, l'accumulation des NPs sur toute la surface des bactéries, peut être observée à l'échelle de la cellule unique et sur plusieurs cellules (Pagnout *et al.* 2012; Sondi and Salopek-Sondi 2004). Le MEB est également utilisé en amont du MET, afin d'avoir une vision d'ensemble de l'effet de NPs sur des bactéries (Sondi and Salopek-Sondi 2004). En outre, le microscope confocal est régulièrement utilisé en complément du MEB, car lors de l'observation de biofilms bactériens, l'usage du microscope confocal permet de considérer des échantillons entièrement hydratés, mais ne permet une résolution optique que de l'ordre du micromètre. Le MEB nécessite de procéder à une étape de déshydratation de l'échantillon pour pouvoir l'observer, mais permet l'obtention d'images à une résolution de l'ordre du nanomètre (Guiot *et al.* 2002).

La **Microscopie Electronique à Transmission (MET)** est une des techniques d'imagerie les plus utilisées pour l'observation d'objets à l'échelle nanométrique, avec un pouvoir de résolution de 0,2 nm. Elle permet une visualisation directe des changements morphologiques au sein de cellules ou microorganismes, par le biais d'une image formée par la transmission d'électrons à travers l'échantillon. Elle est également utilisée en complément de l'AFM pour examiner des sections d'échantillons de très faible épaisseur (entre 50 et 100 nm). Elle ne permet pas d'observer des échantillons en 3D, mais différentes coupes d'un même échantillon peuvent être observées et assemblées, dans un second temps, à l'aide de logiciels de traitement d'image. Cependant, le rayonnement d'électrons est très destructeur pour les échantillons biologiques, il est donc nécessaire de minimiser la dose d'électrons envoyée pour ne pas les dégrader.

La précision apportée par la MET est mise à profit pour observer, à l'échelle de la cellule unique, les dommages des NPs d'oxydes métalliques comme le zinc ou l'argent sur les parois bactériennes. Ainsi, il a été mis en avant dans différentes publications (Brayner *et al.* 2006; Choi *et al.* 2010; Sondi and Salopek-Sondi 2004) que ces NPs peuvent causer la désorganisation de la paroi bactérienne, modifier l'intégrité de la paroi par la création de « trous » et d'« impacts », s'agréger sur la surface membranaire et causer un déversement du contenu interne de la cellule dans le milieu d'observation. De plus, les NPs sont susceptibles d'interagir avec les substances intracellulaires des cellules détruites et de s'agglomérer à leur contact. Par ailleurs, la possibilité d'observer directement l'intérieur des cellules permet la mise en évidence de phénomènes d'internalisation des NPs (Brayner *et al.* 2006). Les observations au MET ont également permis de souligner l'importance de la structure et de la composition de la surface bactérienne sur les phénomènes d'agrégation et d'endocytose des NPs, et plus particulièrement, le rôle des protéines surfaciques dans les interactions hydrophobiques bactéries / NPs (Hayden *et al.* 2012). En outre, l'observation de la forme et de la taille des NPs au MET, avant et après contact avec les bactéries, permet une corrélation avec les données acquises en électrophorèse, et la mise en avant de l'importance de la répartition des charges dans les interactions NPs / bactéries (El Badawy *et al.* 2011; Silva *et al.* 2014). Le MET peut également être couplé à des méthodes d'analyse à rayons X (Morones *et al.* 2005; Thill *et al.* 2006).

Les parois des bactéries et les différentes biostructures surfaciques bactériennes (*e.g.* pili, fimbriae, substances polymériques extracellulaires) peuvent être dégradées par l'observation classique du MET qui s'effectue sous vide et après certaines étapes intervenant dans le protocole de synthèse d'échantillons (*e.g.* séchage, fixation à l'aldéhyde, rinçage à l'éthanol) (Gaboriaud and Dufrêne 2007; Guiot *et al.* 2002; Hardij *et al.* 2013). Par ailleurs, il est possible de verser une résine sur l'échantillon pour que la découpe de fines sections soit facilitée (Thill *et al.* 2006). Concernant l'observation d'échantillons biologiques, des techniques de préparations particulières sont nécessaires afin de

préserver au mieux leurs structures. En outre, des méthodes de congélation-hydratation ou des cryotechniques, appelées *freeze-substitution*, permettent de rapidement fixer les bactéries sur les supports. Cependant, ces cryotechniques peuvent avoir des effets sur la biologie de la cellule, rendant par exemple difficile la distinction de certaines parties de la paroi bactérienne (Terry J. Beveridge 1999). Mais cette technique de cryogénie peut permettre d'observer des NPs en contact avec des bactéries dans des suspensions aqueuses sans artefact de séchage, montrant ainsi l'existence de plusieurs populations au sein d'un même échantillon en fonction des conditions du milieu (Planchon *et al.* 2013). D'autre part, il est à noter que, du fait des techniques mises en œuvre pour réaliser les échantillons, le MET ne semble pas adapté à l'observation de biofilms.

2.2.3 La Microscopie à Force Atomique (AFM)

L'AFM permet de cartographier avec une haute résolution la surface d'un échantillon d'un point de vue topographique mais également de mesurer les forces d'interaction. La sonde utilisée est constituée d'une pointe fixée sur un levier. Le signal de détection est une mesure de la déflexion du levier dans la direction Z (verticale par rapport à l'échantillon) à l'aide d'un laser. En effet, à l'approche de l'échantillon, la pointe subit des forces d'attraction ou de répulsion résultant de différents types d'interactions (*e.g.* électrostatiques, van der Waals, hydrophobes). C'est cette déflexion qui est utilisée pour mesurer la force entre la pointe et l'échantillon. Le mode *Tapping* est le mode privilégié dans le cas de l'observation d'échantillons biologiques fragiles, car son principe repose sur un contact intermittent de la pointe sur l'échantillon pendant la phase de scan. La résolution latérale d'un AFM est de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Le fonctionnement de l'AFM est décrit dans le **chapitre 2 § II.1**.

L'utilisation de l'AFM est très appropriée pour la cartographie 3D des surfaces de cellules microbiennes, pour investiguer leur morphologie et pour la détection de changements très subtils dans ces mêmes cellules (Camesano *et al.* 2000; Gaboriaud and Dufrêne 2007; Stoimenov *et al.* 2002). En effet, elle permet d'accéder à des données comme la rugosité, renseignant sur l'état de surface de l'échantillon observé (Francius *et al.* 2011), la répartition des charges de surface à l'échelle de la cellule unique, et de mesurer les principales interactions entre une bactérie donnée et une particule seule grâce à la fonctionnalisation de pointe (Beaussart *et al.* 2018a). Cependant, l'AFM ne permet d'étudier qu'un nombre restreint de cellules et une minimisation de la force appliquée est nécessaire pour préserver l'intégrité de l'échantillon. De plus, dans le cas des mesures de force, des sauts de pointes au contact des surfaces étudiées peuvent survenir à très courte distance, ce qui rend difficile la quantification des attractions électrostatiques (Beaussart *et al.* 2018b). D'autres difficultés sont à noter telles que la difficulté de greffer des NPs aux pointes AFM, ou la probabilité que ces NPs se décrochent de la pointe lors de l'investigation de la surface de l'échantillon.

Par ailleurs, l'investigation de biofilms par AFM est difficile. En effet, l'échantillon doit être fixé par des agents chimiques susceptibles de dégrader le biofilm. La pointe AFM utilisée pour parcourir la surface du biofilm peut l'endommager en le parcourant et s'encrasser du fait des EPS présents dans la matrice. De plus, la zone maximum imagée par l'AFM est limitée, il est donc difficile d'observer de grandes zones avec un grossissement élevé. Il n'est par ailleurs pas possible de visualiser les parois latérales des éléments observés (Beech *et al.* 2002).

Ainsi, la morphologie et les caractéristiques des structures membranaires de bactéries planctoniques peuvent être observées à l'air ou en liquide, en présence ou non de NPs. A l'air, les solutions de bactéries et de NPs sont fixées sur du mica fonctionnalisé chargé positivement. L'AFM permet d'observer avec précision la réorganisation des surfaces membranaires des bactéries (principalement des LPS) du fait du contact avec des NPs et de l'invagination de ces NPs au sein de la bactérie. Il apparaît que les bactéries peuvent ainsi subir un changement de forme (de cylindrique à sphérique) ou même être « décorées » par des NPs. Des cratères ou des pores peuvent également être causés par cette exposition à des NPs, et des composants de la paroi bactérienne peuvent être répartis sur la surface de l'échantillon, témoignant d'une lyse cellulaire. Il a également été montré que les parois bactériennes sont beaucoup plus affectées par des NPs positives que par des NPs négatives. Cependant, des phénomènes de capillarité, dus à l'étape de séchage de l'échantillon, peuvent être suffisamment importants pour amener les NPs au contact des bactéries, malgré une charge surfacique de signe identique des NPs et des bactéries (Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Miyazaki *et al.* 2014; Ramalingam *et al.* 2016; Stoimenov *et al.* 2002). Ainsi, afin d'éviter les artefacts liés au séchage lors de la préparation des échantillons, et par suite limiter la dégradation des biostructures de surface, les mesures en environnement liquide sont à privilégier (Hardij *et al.* 2013). Par ailleurs, il est à noter qu'à l'aide de logiciels de traitement, associés aux appareils AFM, il est possible de déterminer la rugosité de surface d'une bactérie, ou d'un biofilm bactérien. Il a ainsi été montré par exemple que les NPs, en interagissant avec la paroi bactérienne, peuvent augmenter la rugosité des bactéries (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018; Ramalingam *et al.* 2016).

En mode spectroscopie de force, des courbes de forces sont obtenues et sont décomposables en deux parties : une courbe d'approche et une courbe de retrait (***cf.*** **Chapitre 2 § II.1 Figure 24 B**). Les propriétés mécaniques de la surface de l'échantillon peuvent être déterminées à partir de la courbe d'approche. Il est en effet possible d'accéder aux valeurs du module d'élasticité ou module d'Young (Even *et al.* 2017). Ce dernier permet de comprendre et de quantifier les effets des NPs sur les surfaces membranaires bactériennes. La mesure des propriétés mécaniques se fait dans l'environnement physiologiques des bactéries, c'est-à-dire en liquide, pour cartographier l'ensemble de la surface en observation. Les modifications d'élasticité de la paroi bactérienne peuvent directement être mises en

relation avec le fait qu'elles aient été en contact avec des NPs. Par exemple, dans Mathelié-Guinlet *et al.* 2018, une diminution du module d'Young est constatée du fait d'une désorganisation des LPS de la membrane externe de bactéries *E. coli*, et d'une perméation des NPs de SiO_2 de 4 nm de diamètre dans la couche de peptidoglycane. Ces NPs sont ainsi responsables de la destruction des couches de peptidoglycane des surfaces membranaires bactériennes et conduisent ainsi à la lyse cellulaire. Par ailleurs, à partir de la courbe de retrait de la pointe, il est possible de quantifier les forces d'adhésion entre des NPs fixées sur des pointes AFM, on parle de pointes fonctionnalisées, et des surfaces bactériennes. En effet, la diminution (respectivement l'augmentation) de ces courbes d'adhésion peut s'expliquer par des interactions électrostatiques répulsives (respectivement attractives) entre NPs et surfaces bactériennes. Les différents composants des surfaces membranaires bactériennes jouent un rôle sur la charge volumique et donc sur les interactions électrostatiques avec les NPs (Beaussart *et al.* 2018a).

2.2.4 L'holotomographie

L'holotomographie est une technique de microscopie combinant la tomographie et les hologrammes. A ce jour, seules 2 compagnies, fondées en 2010, développent et commercialisent cette technologie : Nanolive® et Tomocube®. La technologie de l'holotomographie permet à l'utilisateur d'explorer les tissus vivants de façon quantitative, dynamique et non-invasive, et de fournir une représentation 3D directe d'objets transparents épais sans agents de contraste ou de marquage fluorescent, dans le but de décrire les propriétés et constituants de l'échantillon en se basant sur les indices de réfraction (Kim *et al.* 2013a). Le principe de fonctionnement est présenté dans le **chapitre 2 VI**. La résolution latérale est de l'ordre de 100 nm et la résolution verticale de 200 à 400 nm selon les constructeurs (Ali *et al.* 2016; Lee *et al.* 2019). L'épaisseur maximum de l'échantillon doit être inférieure à 80 µm, mais les conditions optimales d'observation sont atteintes entre 30 et 40 µm. La morphologie réelle de l'échantillon peut ainsi être observée (Kim *et al.* 2017). Peu de réglages sont nécessaires pour utiliser un holotomographe, la mise au point est automatique et la vitesse d'acquisition est relativement rapide (entre 0,5 et 2,5 images par seconde selon les constructeurs, au minimum, en prenant pour référence le cas où toutes les options disponibles sont activées). Cependant, en fonction des technologies, la calibration de la surface de référence par rapport à l'objectif n'est pas toujours ajustable par l'utilisateur ou peut s'avérer difficile selon les caractéristiques de l'échantillon. En effet, un échantillon turbide ou dense complique la calibration, car le laser dirigé vers l'échantillon est absorbé par ce dernier, et l'hologramme ne peut donc pas être constitué. Une quantification des données, comme l'épaisseur et le volume d'un biofilm, nécessite un traitement en post-production avec le logiciel constructeur, ou avec des logiciels type Matlab. Le **chapitre 4** de cette thèse développera cet aspect.

A l'heure actuelle, plusieurs études ont été menées sur des cellules sanguines, afin d'obtenir des informations sur leurs propriétés morphologiques et biochimiques (Kim *et al.* 2016a; Yoon *et al.* 2015), et également lorsqu'elles sont exposées à des parasites (Kim *et al.* 2013b). La technologie de l'holotomographie n'étant commercialisée que depuis récemment, il n'existe que quelques recherches qui mettent en avant son utilité pour l'observation de bactéries, sous forme planctonique ou de biofilm, exposées à des NPs.

Par exemple, dans Yang *et al.* 2013a, l'holotomographie est combinée à la microscopie à fluorescence X pour effectuer une analyse élémentaire des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. La combinaison de ces techniques permet d'éviter *e.g.* l'utilisation de sondes fluorescentes, et ainsi d'observer les biofilms dans leur état naturel.

Dans Sadrearhami *et al.* 2019, l'holotomographie a été employée pour observer des substrats en verre recouverts de polydopamine (pDA) (notée 5S en **Figure 16**, 5S correspondant à l'application de 5 couches de pDA). A la surface de ceux-ci ont été déposés du polyéthylène glycol (PEG) et du monoxyde d'azote (NO), le but étant de déterminer leurs effets, isolément et conjugués, sur l'inhibition du développement de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, à Gram-négatif. La tomographie permet de rendre compte que l'effet combiné de la pDA et du NO inhibe l'attachement bactérien de 69 % (**Figure 16**).

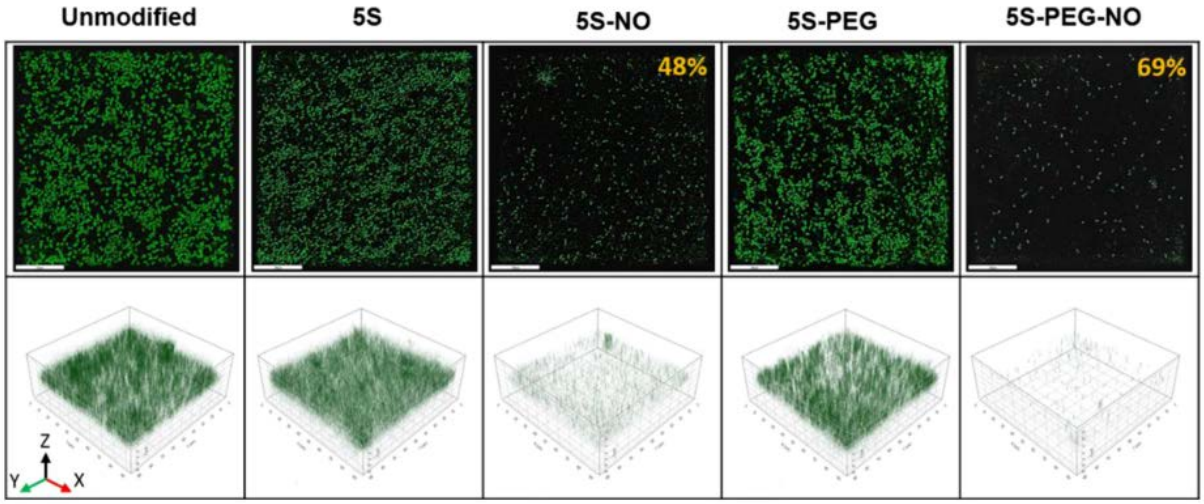


Figure 16 : Images 2D et 3D par tomographie de substrats de verre recouverts de pDA sur lesquels ont été appliqué du PEG et/ou du NO avant dépôt de bactéries *Pseudomonas aeruginosa*. D'après (Sadrearhami *et al.* 2019).

Dans Oliver *et al.* 2018, des NPs d'argent ont été liées à de la catéchine, un antioxydant, à l'aide de différents types de stabilisants. Le diamètre de ces NPs est compris entre 8 et 40 nm de diamètre, selon le stabilisant utilisé. Après 60 min d'exposition des biofilms aux NPs à une concentration de

5 µg.mL^{-1}, il s'avère que ce sont les effets combinés des NPs d'argent et de l'oligomère de catéchine qui causent l'inhibition de la croissance des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* la plus importante. En effet, les volumes des biofilms ont été quantifiés à partir de la coloration numérique des images 3D obtenues et, dans le cas des NPs combinées à l'oligomère de catéchine, dont le diamètre est de 8 nm, 99 % du volume observé est vide (**Figure 17**).

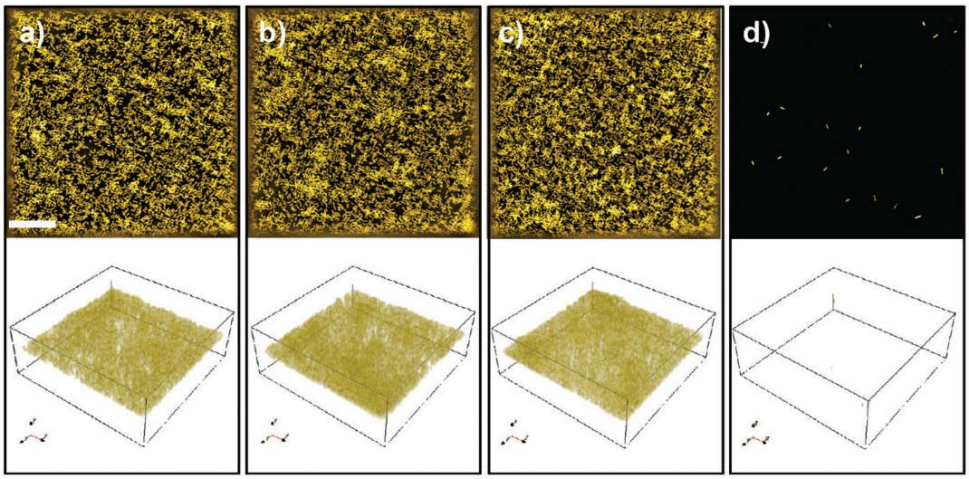


Figure 17 : Représentations 2D et 3D par tomographie de la structure de biofilms de *Pseudomonas* mis en contact avec des NPs d'argent décorées de dérivés de catéchine. a) désigne le biofilm de *Pseudomonas* seules et b) c) et d) des biofilms exposés à des dérivés de la catéchine. Plus précisément d) correspond au biofilm exposé à des NPs d'argent liées à un oligomère de catéchine. D'après Oliver *et al.* 2018.

Dans ce chapitre ont été présentées différentes techniques d'observation et de caractérisation des interactions entre NPs et bactéries à l'état planctonique et à l'état de biofilm. Dans la suite de cette thèse (**Chapitre 3**), l'électrophorèse est utilisée comme méthode pour accéder à la mobilité électrophorétique des NPs et des bactéries en systèmes isolés et mixtes. Ainsi, le modèle physique analytique d'Ohshima donne accès à la densité de charge volumique des particules et à la longueur de pénétration hydrodynamique du fluide à travers la couche molle des particules considérées. De plus, les signatures électrocinétiques sont analysées afin de déterminer l'influence des appendices de surfaces et du pH sur la nature des interactions entre NPs et bactéries. La morphologie des cellules bactériennes est investiguée par AFM et la rugosité de leurs surfaces est estimée. Enfin, l'analyse par holotomographie (**Chapitre 4**) de la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs est menée à travers différents proxys caractérisant la structure du biofilm (*e.g.* épaisseur, profil de densité, ou l'identification de 'cheminées' à l'interface biofilm/solution).

Chapitre 2 : Matériaux, Matériel et Méthodes expérimentales

I. Matériel 71

1. Souches bactériennes 71

2. Nanoparticules 74

II. Imagerie des structures pariétales des bactéries et des modifications structurales induites par la présence des NPs 77

1. Microscopie à Force Atomique 77

2. Imagerie à l'air 79

3. Imagerie en liquide 80

III. Détermination de la taille des nanoparticules de silice 82

1. Présentation du NanoZS 82

2. Préparation du batch de nanoparticules 84

IV. Caractérisation électrocinétique des systèmes simples et binaires 85

1. Electrophorèse 85

2. Etude des systèmes simples de particules seules (bactéries ou NPs) 87

2.1 Préparation des batchs de bactéries 87

2.2 Préparation du batch de nanoparticules 89

3. Etude des systèmes binaires NPs/bactéries 89

V. Préparation des biofilms 92

1. Formation d'un biofilm bactérien en microplaque 92

2. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre 93

3. Formation d'un biofilm bactérien en dish 94

4. Formation d'un biofilm avec bactéries et NPs en dish 95

VI. L'holotomographie comme outil d'investigation de la structure des biofilms 98

Afin de comprendre les interactions physico-chimiques entre NPs et bactéries, à l'état planctonique et de biofilm, la sélection de systèmes appropriés est primordiale. Ainsi, sont présentées dans ce chapitre les NPs choisies, arborant différents groupements terminaux, ainsi que les souches bactériennes, arborant de manière sélective plusieurs types de biostructures pariétales. Les méthodes de caractérisation des différents systèmes simples (NPs ou bactéries) et binaires (NPs/bactéries), ainsi que les méthodes de détection des modifications structurales induites par les interactions interparticulaires, à l'échelle de la cellule unique et du biofilm, sont ensuite présentées. La **Figure 18** résume les différentes expérimentations réalisées sur les systèmes considérés.

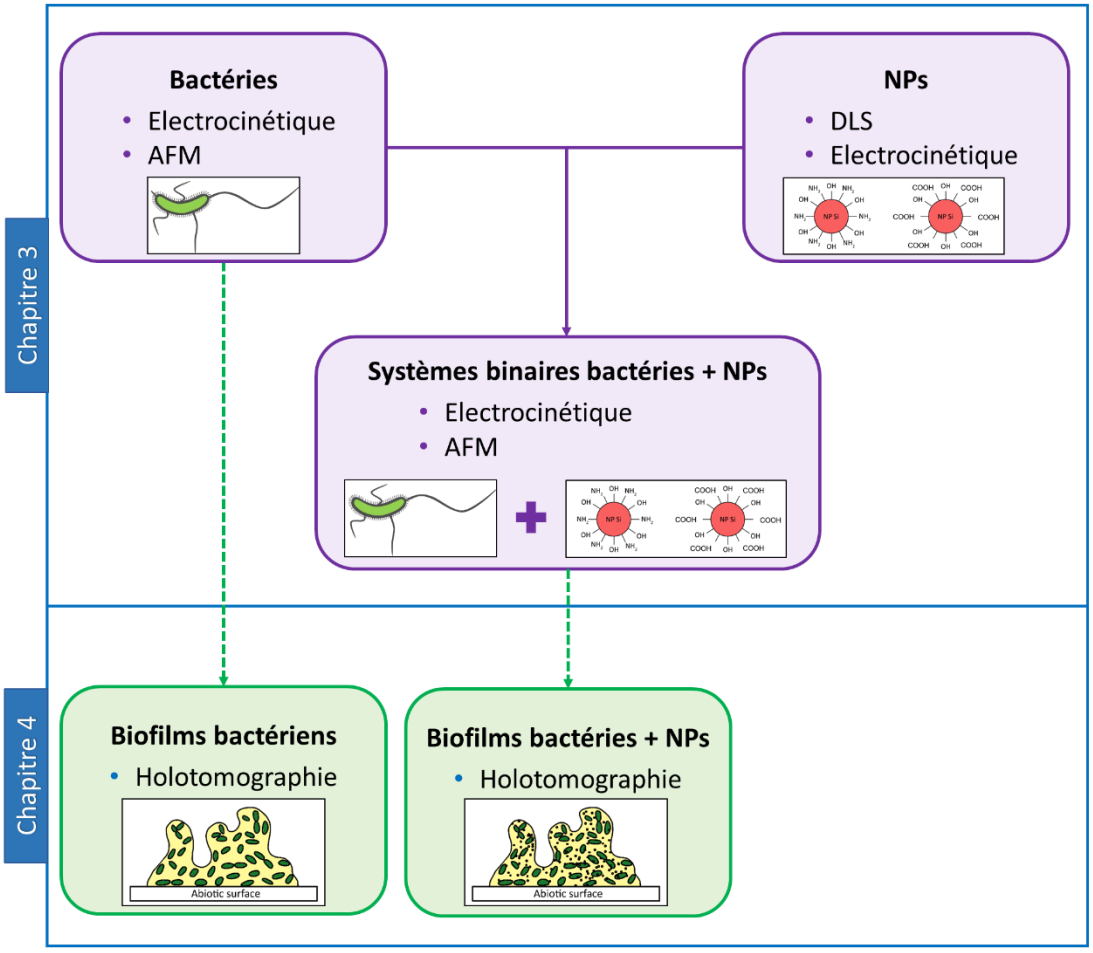


Figure 18 : Expérimentations réalisées dans le but de déterminer l'influence des groupements surfaciques des NPs et des biostructures pariétales bactériennes sur les interactions physico-chimiques entre NPs et bactéries. Le chapitre 3 traite de l'électrophorèse comme méthode de détection des modifications structurales induites par les NPs sur les bactéries. Le chapitre 4 présente l'holotomographie comme technologie permettant l'observation de biofilms bactériens.

I. Matériel

1. Souches bactériennes

Différentes souches bactériennes *Escherichia coli* K12, génétiquement modifiées pour présenter différentes biostructures pariétales de manière sélective, ont été sélectionnées pour cette thèse. Le **Tableau 1** présente les appendices de surface exprimés pour chaque souche, ainsi que leur génotype, leur résistance aux antibiotiques et la concentration d'antibiotiques utilisés pour leur culture. Ces souches nous ont été aimablement fournies par l'Unité de Génétique des Biofilms du département de microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris. Les 8 souches bactériennes sont également modifiées de sorte à exprimer la *Green Fluorescence Protein* (GFP) (Shimomura 1979; Tsien 2018), afin qu'elles soient facilement détectables par des techniques de microscopie à fluorescence. L'expression par une bactérie de la GFP est obtenue par construction sur un plasmide d'une région avec un gène de résistance antibiotique et du gène codant la GFP. Dans un second temps, cette région est recombinée sur le génome de la bactérie *E. coli*. Initialement, il était prévu d'observer la structure des biofilms à l'aide de la microscopie confocale à fluorescence. Néanmoins, l'opportunité d'utiliser l'holotomographie nous a été proposée, et l'observation des biofilms par le biais de cette technique de microscopie, ne nécessitant aucun marquage fluorescent, a été privilégiée.

Les 7 premières souches bactériennes du **Tableau 1** ont le même fond génétique, et sont générées à partir de la souche *E. coli* MG1655 par construction de fragments linéaires d'ADN en utilisant l'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, abrégé en PCR). Les constructions sont ensuite insérées dans le génome des *E. coli* par recombinaison λ *red*. La souche E2152 ne possède pas de biostructures pariétales et constitue un témoin par rapport aux souches E2146 (présentant des fimbriae de type I), E2498 (présentant la protéine Ag43), E2551 (présentant la protéine YeeJ) et E2302 (présentant des pili-F). La souche E247 présente des fimbriae Ycb et sa souche contrôle est la E2432. Différente des 7 autres souches, la souche E751 arbore des pili-F, des fimbriae de type I et la protéine Ag43. Cette souche est utilisée en tant que témoin de la formation des biofilms.

Les stocks à -80°C de ces souches sont constitués à partir de 920 µL de pré-culture dans un milieu nutritif riche, le Lysogeny Broth (LB) (BD Difco®), ajoutés à 390 µL de glycérol 50 % (Sigma-Aldrich®), stérilisé par filtration 0,22 µm.

Tableau 1 : Récapitulatif des souches bactériennes *E. coli* étudiées.

Amp = Ampicilline, Cm = Chloramphenicol, Km = Kanamycine, Zeo = Zeocine, Tet = Tétracycline, **X** = Absence, **O** = Présence, ^{R} = résistance

Souche	Fond génétique	Génotype	Appendices de surface exprimés					Résistance aux antibiotiques	Antibiotiques pour les cultures
			Protéine Ag43	Protéine YeeJ	Fimbriae type 1	Pili-F	Fimbriae Ycb		
E2152	MG1655 (E2072)	MG1655_*gfp*_Δ*fli* _Δ*flu*::km_Δ*fimA-H*::zeo	X	X	X	X	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Km : 50 µg.mL^{-1}
E2146	MG1655 (E2072)	MG1655_*gfp*_Δ*fli* _Δ*flu*::zeo_kmPcL*fimA-H*	X	X	O	X	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Km : 50 µg.mL^{-1}
E2498	MG1655 (E2072)	MG1655_*gfp*_Δ*fli* _kmPcL*flu*_Δ*fimA-H*::zeo	O	X	X	X	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Km : 50 µg.mL^{-1}
E2551	MG1655 (E2072)	*MG1655_gfp_Δfli _Δflu_ΔfimA-H::zeo_kmPcLyeeJ*	X	O	X	X	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Km : 50 µg.mL^{-1}
E2302	MG1655 (E2072)	MG1655_*gfp*_Δ*fli*_Δ*flu*::km_ Δ*fimA-H*::zeo_F'tet	X	X	X	O	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}, Tet^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Tet : 50 µg.mL^{-1}
E247	MG1655 (E2072)	*MG1655_gfp_Δfli _Δflu_ΔfimA-H::zeo_kmPcLycb*	X	X	X	X	O	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1} Km : 50 µg.mL^{-1}
E2432	MG1655 (E2072)	*MG1655_gfp_Δfli _Δflu_ΔfimA-H::zeo ('control' strain for F247)*	X	X	X	X	X	Amp^{R}, Cm^{R}, Km^{R}, Zeo^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1}
E751	TG1	TG1_*gfp* (Strong former biofilm)	O	X	O	O	X	Amp^{R}	Amp : 100 µg.mL^{-1}

Après une étape de pré-culture en milieu riche LB, les cultures bactériennes sont effectuées dans du milieu synthétique minimum M63B1 contenant 0,4 % w/w de glucose, et noté M63B1glu. La composition de ce milieu est détaillée dans le **Tableau 2**. Lors de la synthèse de ce milieu, après l'ajout des 5 premiers constituants, le pH est ajusté à 7 à l'aide de KOH (Fluka®) 4 M. La solution de glucose est stérilisée à l'aide d'un filtre de 0,22 µm (Acrodisc®) et ajoutée au milieu M63B1, après une étape de stérilisation à l'autoclave.

Tableau 2 : Composition du milieu M63B1glu utilisé pour la pré-culture 1 et la culture des bactéries

Composants	Concentration ($g.L^{-1}$)	Fournisseur
KH_2PO_4	13,6	Sigma-Aldrich®
$(NH_4)_2SO_4$	2,00	Emsure®
$MgSO_4,7H_2O$	0,10	Emsure®
$FeSO_4,7H_2O$	$5,00\times10^{-4}$	Sigma-Aldrich®
Thiamine	$1,00\times10^{-3}$	Roth®
Glucose	4,00	Sigma-Aldrich®

Pour l'observation et/ou l'utilisation de bactéries à l'état planctonique, le protocole de culture comprend plusieurs étapes résumées en **Figure 19**.

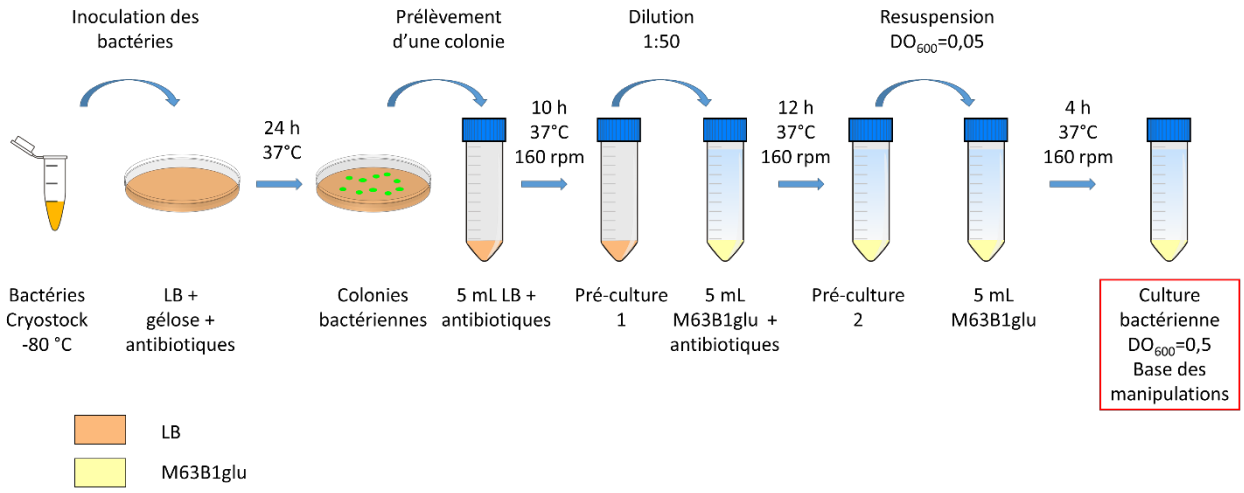


Figure 19 : Protocole de réalisation de suspensions bactériennes planctoniques

En milieu stérile, des bactéries sont prélevées du cryostock et déposées sur une boîte de gélose composée de LB et des antibiotiques nécessaires (**Tableau 1**). Après 24 h en étuve à 37°C, une unique colonie de bactérie est prélevée et déposée dans 5 mL de milieu LB. Après 10 h de culture à 37°C, avec une agitation de 160 rpm, la pré-culture est diluée à un ratio de 1:50, dans le milieu minimum M63B1glu, avec les antibiotiques nécessaires. Après 12 h de culture, dans des conditions identiques à celles de la 1ère pré-culture, les cellules bactériennes sont re-suspendues dans du M63B1glu frais, sans

antibiotiques, jusqu'à atteindre une valeur de DO_{600}[2] de 0,05. Cette culture est ensuite placée à 37°C et sous une agitation de 160 rpm jusqu'à ce qu'une DO_{600} de 0,5 soit atteinte.

2. Nanoparticules

Le choix des NPs pour mener cette étude s'est porté sur des NPs de silice (SiNPs) fonctionnalisées par différents groupements surfaciques. Elles nous ont été aimablement fournies par l'Instituto Superior Técnico de l'Université de Lisbonne, au Portugal. Ces NPs sont synthétisées d'après un protocole de Stöber modifié (Crucho *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2017, 2014; Stöber *et al.* 1968). Il consiste en l'hydrolyse et la condensation de tetraethoxysilane (TEOS) dans l'éthanol et en présence d'ammoniac comme catalyseur. La surface des NPs est ensuite modifiée dans du toluène anhydre, sous atmosphère d'argon (Crucho *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2014). Les NPs de silice sont ensuite décorées soit de groupements carboxyliques (-COOH), les NPs sont alors notées SiCOOH, soit de groupements amines ($-NH_2$), les NPs sont notées $SiNH_2$. La répartition de ces groupements est déterminée par résonance magnétique nucléaire (Crucho *et al.* 2017) et est de 2 groupements de surface par nm². Il est ainsi attendu que, en fonction du pH, la charge de surface des NPs SiCOOH soit négative, et celle des NPs $SiNH_2$ positive. D'après les observations au MET effectuées par l'Instituto Superior Técnico de Lisbonne, le diamètre de ces NPs est de 130 nm ± 10 nm (**Figure 20**).

Par ailleurs, durant leur synthèse, un dérivé de perylenediimide arborant un groupement terminal alkoxysilane (nommé PDI-NIR) est incorporé dans les NPs, et lié, de manière covalente, au réseau de silice. Ce composé est un marqueur fluorescent permettant de distinguer les NPs lors d'observations menées à l'aide de techniques de microscopie à fluorescence. Sa longueur d'onde maximum d'excitation est de 689 nm et celle d'émission de 742 nm, c'est-à-dire en proche infra-rouge (Ribeiro *et al.* 2017, 2014).

[2] La DO_{600} nous renseigne sur la concentration des cellules présentes dans l'échantillon. Il s'agit de la Densité Optique correspondant à l'absorbance, proportionnelle à la concentration des cellules, d'une suspension bactérienne, pour une longueur d'onde de 600 nm. Le principe de mesure est brièvement présenté **§ V.2**.

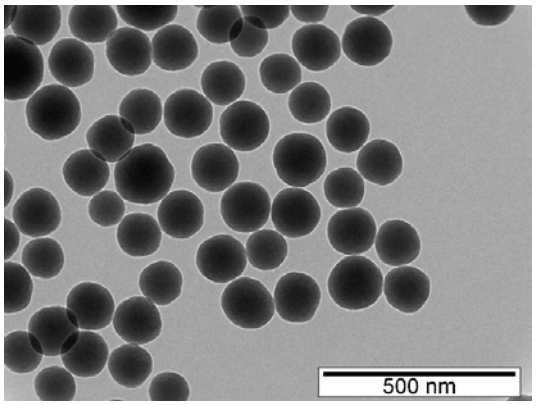


Figure 20 : Images MET des SiNPs

L'utilisation de ces NPs nécessite l'établissement d'un protocole de dispersion en milieu liquide (**Figure 21**). Pour la réalisation des suspensions pour les mesures de taille et de mobilité électrophorétique des NPs, 1 mg de NPs est pesé, sous hotte adaptée à la manipulation de NPs. Cette quantité est ensuite versée dans 5 mL de KNO_3 1 mM sous une agitation de 1000 rpm. Le versement des NPs pendant l'agitation permet une meilleure dispersion dans le milieu liquide. La coupelle de pesée est ensuite rincée au-dessus du tube de solution de NPs avec les 5 mL de KNO_3 1 mM restant. La solution est ensuite laissée sous agitation durant 24 h, puis est soumise aux ultrasons pendant 20 min. Le pH de la solution est ensuite ajusté à l'aide de KOH ou HNO_3 10^{-1} ou 10^{-2} M et 1 h de stabilisation est nécessaire.

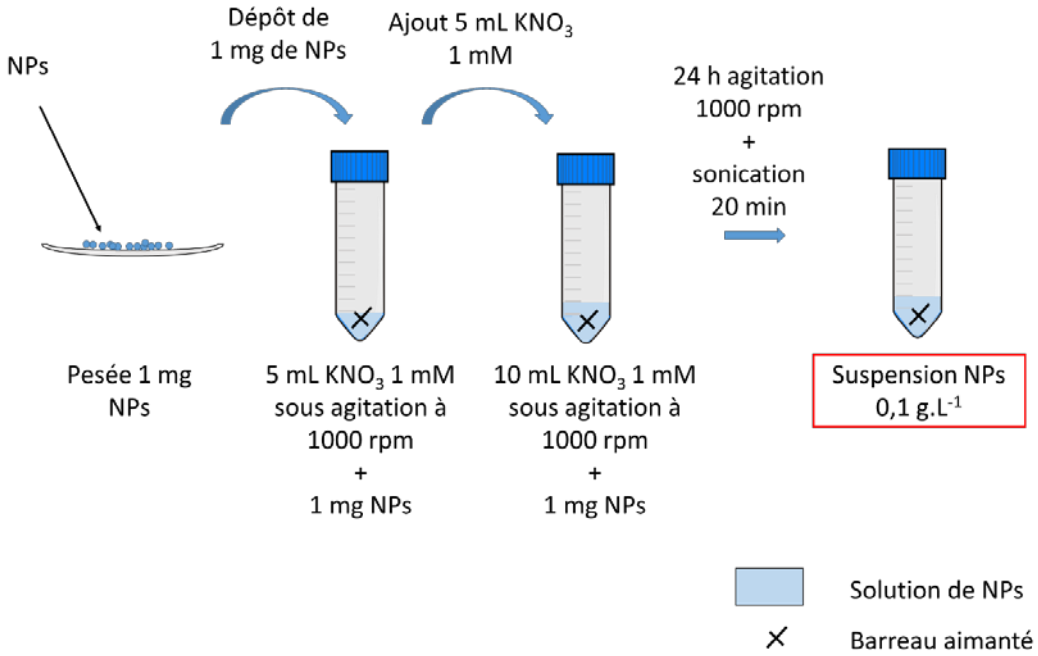


Figure 21 : Protocole de dispersion de SiNPs pour les mesures par électrophorèse et l'observation par AFM des systèmes NPs/bactéries planctoniques

Pour la caractérisation électrocinétique des NPs, des dispersions ont également été effectuées dans du KNO_3 0,1 mM afin d'obtenir la mobilité électrophorétique correspondant à cette force ionique.

Pour la réalisation de biofilms générés en présence de NPs, il est nécessaire que ce protocole de dispersion soit adapté. Ainsi les manipulations doivent se faire en atmosphère stérile, le milieu dans lequel sont dispersées les NPs est le milieu minimum de culture M63B1glu et la solution finale est 10 fois plus concentrée en NPs que dans les suspensions destinées aux mesures de taille et de mobilité électrophorétique μ (**Figure 22**). La concentration en NPs est accrue pour permettre une meilleure visualisation des effets des NPs sur la structure des biofilms dans un laps de temps de 24 h.

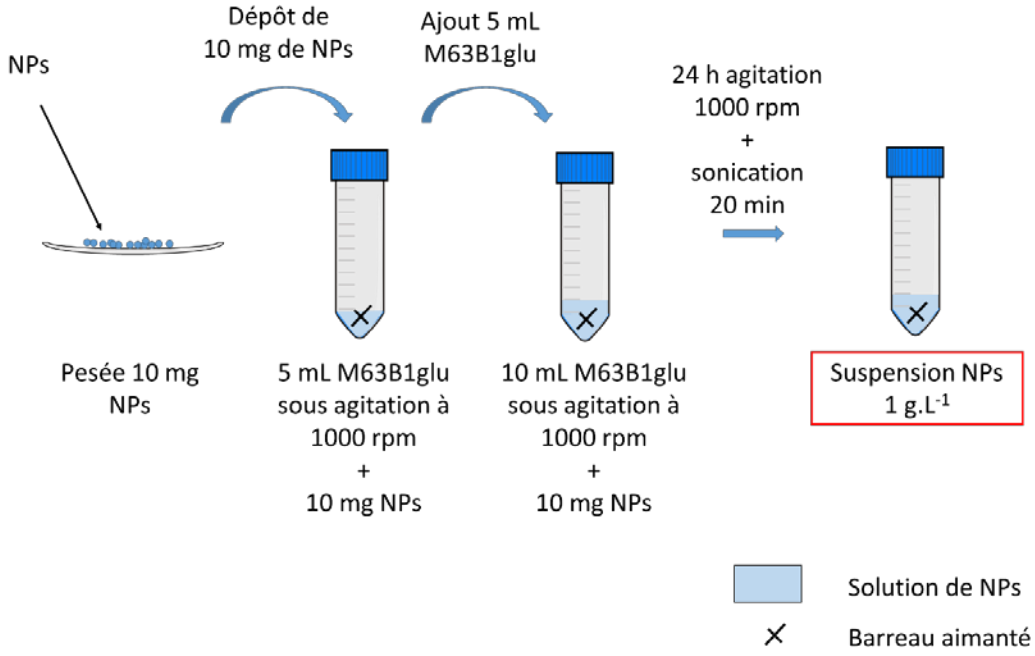


Figure 22 : Protocole de dispersion de SiNPs pour la réalisation des biofilms. Les manipulations sont effectuées sous atmosphère stérile.

II. Imagerie des structures pariétales des bactéries et des modifications structurales induites par la présence des NPs

1. Microscopie à Force Atomique

L'AFM permet d'accéder aux données topographiques, ainsi qu'aux propriétés physicochimiques et mécaniques de surface avec une résolution nanométrique. Historiquement elle a été développée en 1986 par Binnig et Quate (Binnig and Quate 1986) en se basant sur le principe de microscopie à effet tunnel. Cette dernière est une technique de microscopie en champ proche qui utilise l'effet tunnel pour imager des surfaces conductrices ou semi-conductrices, avec une résolution pouvant atteindre la taille d'un atome.

Dans cette thèse, l'AFM a été utilisée pour imager les souches bactériennes en conditions liquides, seules ou avec des NPs après une mise en contact de 15 minutes. Quelques images des bactéries seules ont été effectuées à l'air afin de visualiser les pili-F, indécelables en liquide. Les images ont été obtenues au moyen d'un AFM FastScan Dimension Icon et ont été exploitées à l'aide du logiciel NanoScope Analysis 1.9 (Bruker®).

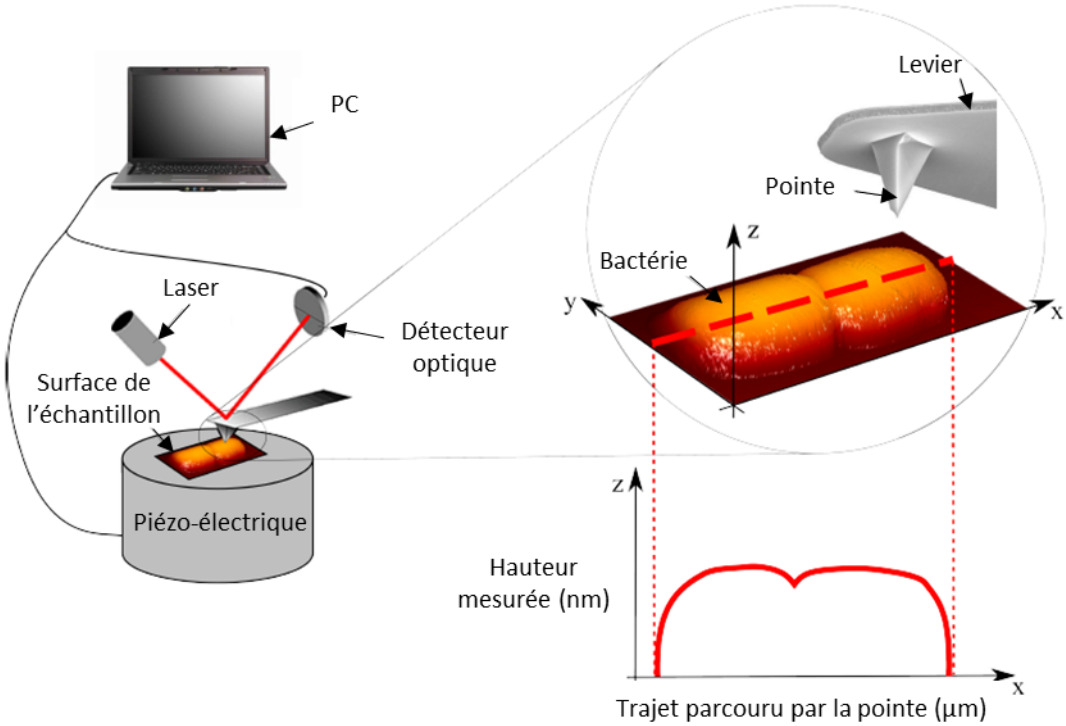


Figure 23 : Principe de fonctionnement de l'AFM (adapté de Présent 2018).

La sonde de l'AFM est généralement composée d'une pointe en nitrure de silicium, fixée sur un levier possédant une constante de raideur fixe. La position de la pointe par rapport à l'échantillon est contrôlée par une céramique piézo-électrique. En parcourant la surface de l'échantillon en x et y, la

sonde subit une déflexion, induite par des interactions (*e.g.* van der Waals, électrostatiques) entre la pointe et la surface de l'échantillon. La déflexion en Z du levier est mesurée à l'aide d'un laser, focalisé sur l'extrémité du levier, et constitue le signal de détection. Plus les forces d'interactions sont fortes plus la déflexion du levier l'est également. Par un jeu de miroirs, la réflexion du laser est collectée par un détecteur à photodiodes, puis est convertie en signal électrique. Ce signal permet ensuite, par le biais du logiciel associé, de reconstruire la topographie de l'échantillon. Ainsi, la déviation du laser permet de déterminer la position de la pointe lorsqu'elle parcourt la surface de l'échantillon et ainsi de déterminer le profil de surface (Dufrêne 2004, 2002)**.** Une représentation schématique du principe de fonctionnement est disponible en **Figure 23**. La loi de Hooke (**Equation 3**) permet de relier la distance de déflexion d de la pointe (exprimée en m) à la force d'interaction F (exprimée en N) qui s'exerce entre la pointe et la surface de l'échantillon considéré (Dufrêne 2008; Gaboriaud and Dufrêne 2007). k_c est la constante de raideur du levier (exprimée en N.m^{-1}).

$$F = k_c \times d \qquad \textbf{(3)}$$

Le mode *Tapping* est privilégié dans le cas d'échantillons biologiques, car il permet de limiter les forces de frottement et de cisaillement, et ainsi de minimiser la dégradation de la surface de l'échantillon (Zhong *et al.* 1993). Ce mode repose sur un contact intermittent entre la pointe et l'échantillon. La pointe oscille à la fréquence de résonance du levier et ne touche que de façon transitoire la surface de l'échantillon étudié. Durant le scan de la surface par la pointe, une boucle de rétroaction électronique permet de maintenir l'amplitude de l'oscillation constante. Lorsque la pointe parcourt l'échantillon, la hauteur de l'échantillon ne se résumant pas à une valeur constante (*i.e.* il existe des aspérités, des creux et des protubérances sur la surface de l'échantillon), la position de la pointe doit être ajustée tout au long du scan pour que l'amplitude demeure constante (Zhong *et al.* 1993).

Le *Peak force tapping* est un mode dérivé du mode *Tapping*. Il permet d'obtenir simultanément une image de la topographie de l'échantillon avec une résolution atomique et une cartographie des propriétés nano-mécaniques en chaque pixel (Alsteens *et al.* 2017; Heu *et al.* 2012). Après une étape de calibration de la pointe, la force maximale imposée de la pointe sur l'échantillon est maintenue constante. La fréquence d'oscillation du levier est très inférieure à sa fréquence de résonnance, ce qui signifie que les interactions physiques entre la pointe et l'échantillon influent sur la déflexion du levier (Alsteens *et al.* 2017; Heu *et al.* 2012).

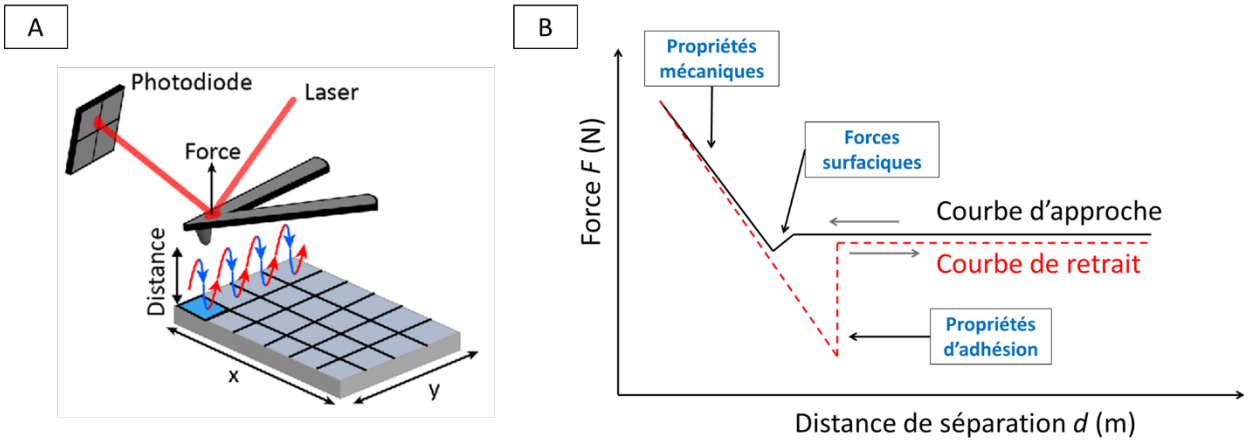


Figure 24 : A : Enregistrement des courbes force-distance obtenues pour chaque pixel lors de l'utilisation du mode *Peak Force Tapping* sur un échantillon (Pfreundschuh *et al.* 2014). B : Courbe approche-retrait obtenue pour chacun de ces pixels (adapté de Gaboriaud and Dufrêne 2007).

Ainsi, pour chaque pixel une courbe force-distance est générée (**Figure 24**), permettant d'accéder à une cartographie *e.g.* des propriétés mécaniques de l'échantillon (MPa), de l'adhésion (pN), de la dissipation (eV) et de la déformation de l'échantillon (nm). Pour la topographie de l'échantillon, une image en hauteur est calculée (m) ainsi qu'une image *Peak Force Error* (N). Le *Peak Force Error* correspond à la différence entre la force imposée de la pointe sur l'échantillon par l'opérateur, et la force réelle provenant du temps de réponse de la boucle de rétroaction permettant de contrôler la force imposée (André 2010, Alsteens *et al.* 2013).

2. Imagerie à l'air

L'imagerie des cellules bactériennes a été effectuée à l'air afin de distinguer des biostructures pariétales non-visibles en liquide, comme les pili-F (***cf.* Chapitre 3 Supplementary material Figure S2**). Pour cela, des pointes MLCT-E avec une constante de raideur de 0,1 $N.m^{-1}$ (Bruker®) ont été utilisées. Du mica, chargé positivement, fixé sur une rondelle (ou *puck*) magnétique, est utilisé comme substrat pour la fixation des bactéries. Ainsi, après les différentes étapes de pré-culture et de culture, 150 µL de solution bactérienne à DO_{600} = 0,5 sont déposés sur le mica, préalablement clivé. Une mise à l'étuve 2 h à 37°C en présence d'eau ultra pure (EUP, afin d'éviter le séchage de l'échantillon) est nécessaire. Après ces 2 h, l'échantillon est rincé à 3 reprises dans de l'EUP, puis mis à sécher pendant 16 h à 37°C (**Figure 25**). La force appliquée pendant l'acquisition de l'image est comprise entre 2 et 10 nN.

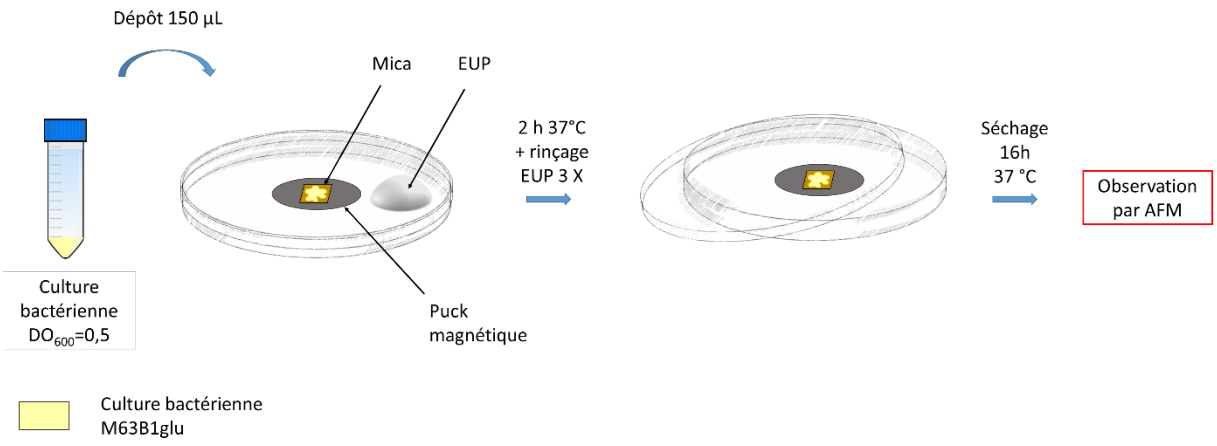


Figure 25 : Protocole de réalisation d'échantillons pour des mesures AFM à l'air

3. Imagerie en liquide

Pour effectuer une topographie des bactéries en milieu liquide, avec ou sans NPs, des pointes NPG-C avec une constante de raideur de 0,12 $N.m^{-1}$ (Bruker®) ont été utilisées. La force imposée est limitée à 7 nN, pour la majorité des échantillons, afin de limiter la dégradation de la surface de la bactérie durant l'observation.

Pour la réalisation des échantillons, des disques de verre sont préalablement nettoyés dans une solution à 1 $g.L^{-1}$ de RBS 25 (Sigma-Aldrich®), à 60°C pendant 30 min. Ils sont ensuite immergés dans une solution de polyethylenimine (PEI), un polymère polycationique, à 1 $g.L^{-1}$ (solution initiale Sigma-Aldrich® à $7,5\times10^6$ Mw, 50 wt % dans de l'eau) pendant 30 min, puis rincés à l'EUP. Le PEI est nécessaire pour l'immobilisation électrostatique des bactéries et permettre ainsi leur observation.

Concernant la préparation des bactéries, après les différentes étapes de pré-culture et de culture, la suspension bactérienne à DO_{600} = 0,5 est centrifugée pendant 5 min à 5000×g, puis re-suspendue dans du KNO_3 1 mM. La suspension bactérienne est diluée pour atteindre une DO_{600}=0,4 et deux manipulations sont ensuite possibles.

Dans le cas d'observations des bactéries, 280 µL de KNO_3 1 mM sont ajoutés, le pH est ajusté si nécessaire à l'aide de KOH ou HNO_3 10^{-1} ou 10^{-2} M, puis l'ensemble est déposé sur le disque en verre recouvert de PEI pendant 30 min. Le disque est ensuite rincé avec du KNO_3 1 mM, puis fixé sur un *puck* magnétique et recouvert de 2 mL de KNO_3 1 mM pour observation à l'AFM.

Pour une observation des systèmes binaires NPs / bactéries, 280 µL de solution de NPs 0,1 $g.L^{-1}$ sont ajoutés, l'ensemble est mis sous agitation 15 min à 600 rpm, puis le pH de la solution est ajusté à l'aide de KOH ou HNO_3 10^{-1} ou 10^{-2} M. La concentration en NPs est alors de 10^{-3} $g.L^{-1}$. L'ensemble est ensuite

déposé sur le disque en verre recouvert de PEI, comme décrit ci-dessus. Ce protocole est schématisé en **Figure 26.**

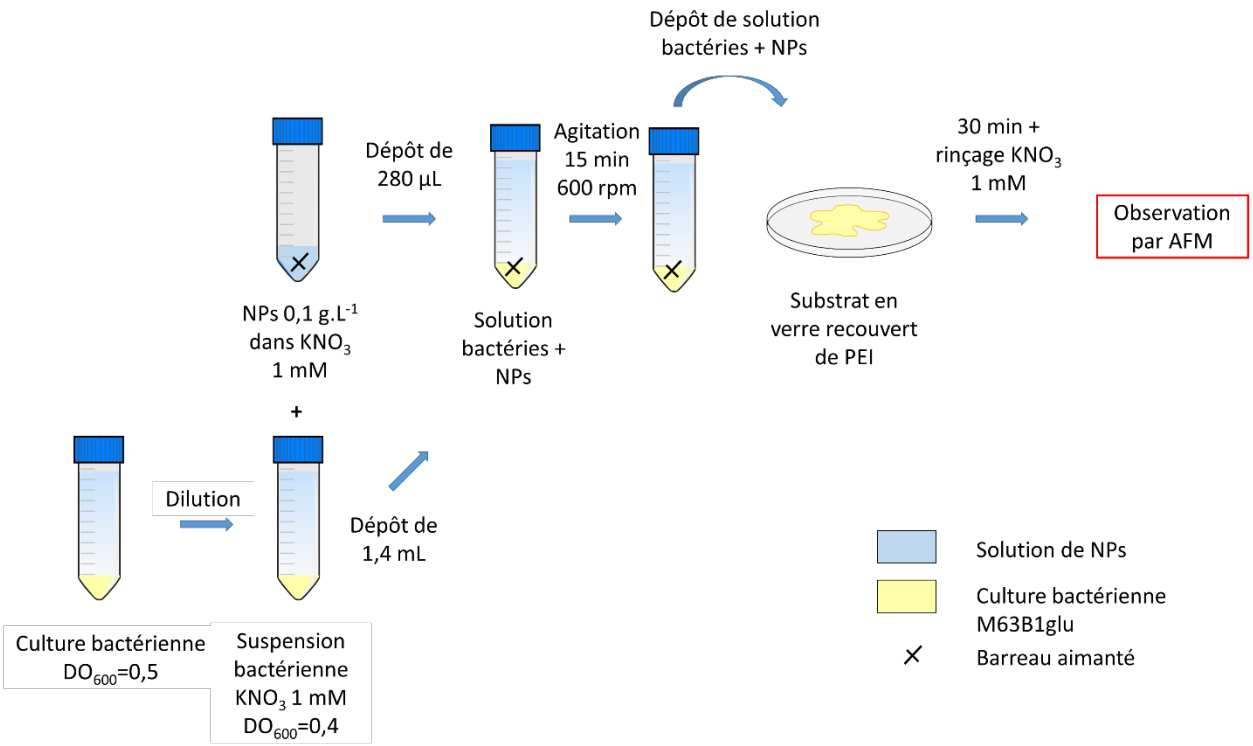


Figure 26 : Protocole de réalisation d'échantillons bactéries + NPs pour des mesures AFM en liquide

III. Détermination de la taille des nanoparticules de silice

1. Présentation du NanoZS

La Diffusion Dynamique de la Lumière (*Dynamic Light Scattering* ou DLS) est employée pour étudier les propriétés des suspensions et des solutions colloïdales. L'utilisation de la DLS, par le biais d'un appareil Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments®), permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique des particules en suspension. Ainsi, au sein du dispositif, un laser d'une longueur d'onde de 633 nm passe par un atténuateur, permettant de focaliser le faisceau dans la cellule afin de réduire l'intensité du laser, et est dirigé sur les particules en suspension dans une cellule de mesure (**Figure 27**). La lumière est alors diffusée dans toutes les directions, dans la mesure où les particules ont une taille inférieure à la longueur d'onde (diffusion de Rayleigh) (Bloomfield *et al.* 1985; Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments Limited 2012). Un photodétecteur mesure, selon un angle de diffusion θ de 175°, l'intensité de la lumière diffusée qui fluctue dans le temps du fait du mouvement Brownien des particules. Ce mouvement Brownien est un mouvement thermique aléatoire que subissent les petites particules en suspension. Il est le résultat de la collision aléatoire des particules avec les molécules de la solution dans laquelle elles sont suspendues. Des informations sur l'échelle de temps et la vitesse des particules sont récupérées à partir de la fluctuation d'intensité de la lumière diffusée.

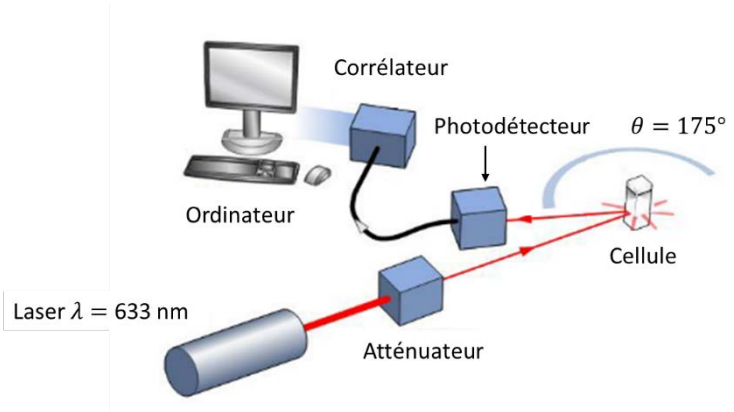


Figure 27 : Schéma du montage de DLS NanoZS (adapté de Malvern Instruments 2013; Moussa 2017)

Un corrélateur mesure le degré de similarité entre l'intensité du signal au temps t et celle à $t + \delta t$ ($t \gg \delta t$). Une fonction de corrélation $G(\tau)$ (**Equation 4**) de l'intensité diffusée I est alors construite telle que :

$$G(\tau) = < I(t).I(t+\tau) > \quad \textbf{(4)}$$

, avec τ le temps d'échantillonnage du corrélateur. Pour des échantillons monodispersés, la fonction de corrélation correspond à une décroissance exponentielle et permet d'obtenir le coefficient de diffusion D_{diff} (m².s^{-1}) de la particule (**Equations 5 et 6**).

$$G(\tau) = A[1 + B\exp(-2D_{diff}q^2\tau)] \qquad \textbf{(5)}$$

$$\text{et } q = \frac{4\pi n}{\lambda}\sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \qquad \textbf{(6)}$$

Avec A la ligne de base de la fonction de corrélation, B l'interception de la fonction de corrélation, qui représente le degré de cohérence spatiale de la lumière diffusée sur le détecteur (**Figure 28**), q le vecteur de diffusion, n l'indice de réfraction de la solution, λ la longueur d'onde du laser émis (m) et θ l'angle de diffusion.

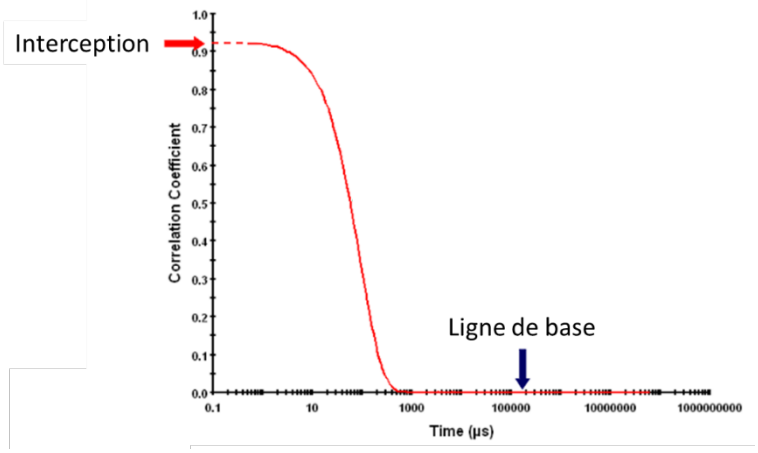


Figure 28 : Exemple d'une fonction de corrélation obtenue avec le NanoZS (adapté de Kaszuba 2015).

Enfin, à partir de D_{diff}, la relation de Stokes-Einstein (**Equation 7**) permet de déterminer le diamètre hydrodynamique D_H (m) des particules,

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{diff}} \qquad \textbf{(7)}$$

où k_B est la constante de Boltzmann (m².kg.s^{-2}.K^{-1}), T la température de mesure (K) et η la viscosité du fluide (kg.m^{-1}.s^{-1}) (Kaszuba *et al.* 2008).

La distribution en taille des particules est fournie en intensité, et la contribution en intensité de chaque particule est proportionnelle, selon le critère de Rayleigh, à leur diamètre exposant 6. Ainsi, les particules de grande taille, ou les agrégats de NPs, sont davantage pris en compte que les particules d'une taille moindre. Pour cette raison, les distributions de taille seront, dans cette étude, présentées en nombre. Une distribution des tailles en nombre signifie que chaque particule contribue de manière

égale à la distribution (Bloomfield *et al.* 1985; Malvern Instruments 2013; Malvern Instruments Limited 2012).

2. Préparation du batch de nanoparticules

Après dispersion des SiNPs (-NH_2 ou -COOH) dans une solution de KNO_3 à 0,1 ou 1 mM et ajustement du pH, (voir **§ I.2**) 0,75 mL sont prélevés pour les mesures de tailles. Le NanoZS effectue 3 mesures par échantillon. Par ailleurs, les mesures de taille ont été effectuées sur 3 à 5 échantillons fraîchement préparés, dans une gamme de pH de 3 à 9, aux forces ioniques suivantes : 0,1, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 et 250 mM. Après chaque mesure à une force ionique donnée, cette dernière est augmentée avec du KNO_3 2M, le pH est ajusté et la mesure de taille suivante est effectuée.

IV. Caractérisation électrocinétique des systèmes simples et binaires

1. Electrophorèse

L'électrophorèse permet d'accéder aux propriétés électrostatiques de surface des particules. Pour cela, la solution de colloïdes considérés est injectée dans un capillaire entre deux électrodes. Un champ électrique statique constant est imposé entre ces deux électrodes. Sous l'effet de ce champ électrique, les colloïdes chargés migrent à travers le capillaire. Les trajectoires de ces colloïdes sont suivies à l'aide d'un laser et d'une caméra. La mobilité électrophorétique μ, exprimée en $m^2V^{-1}s^{-1}$, en est déduite. Cette mesure de mobilité ne peut s'effectuer qu'à l'emplacement des plans stationnaires pour s'affranchir du phénomène d'électro-osmose (**Figure 29**). Ce phénomène apparaît lors de l'application d'un champ électrique $\vec{E}$ parallèle aux parois du capillaire. Au contact d'un milieu aqueux, les parois du capillaire se chargent. Une couche composée d'ions de charge opposée à celle de la surface du capillaire se forme. Les ions de la couche diffuse de la DCE migrent sous l'action du champ électrique, entrainant avec eux le fluide environnant, ayant pour effet de générer un flux aux abords des parois. Un flux de sens opposé est généré au centre du capillaire. Les plans stationnaires (indiqués en pointillés sur la **Figure 29**) se situent à l'emplacement où les deux flux se compensent et où seule l'électrophorèse est impliquée dans le mouvement des particules (CAD Instrumentation 2006; Lyklema 1991b). Habituellement, la mobilité électrophorétique est convertie en potentiel zêta. Cependant, comme expliqué dans le **chapitre 1 § I.2**, dans le cas de particules molles, la notion de potentiel zêta n'est plus applicable du fait de l'impossibilité de définir un plan de cisaillement entre la couche stagnante et la couche mobile de la DCE. Par conséquent, c'est la mobilité électrophorétique μ qui est utilisée pour accéder aux propriétés électrostatiques de ces particules.

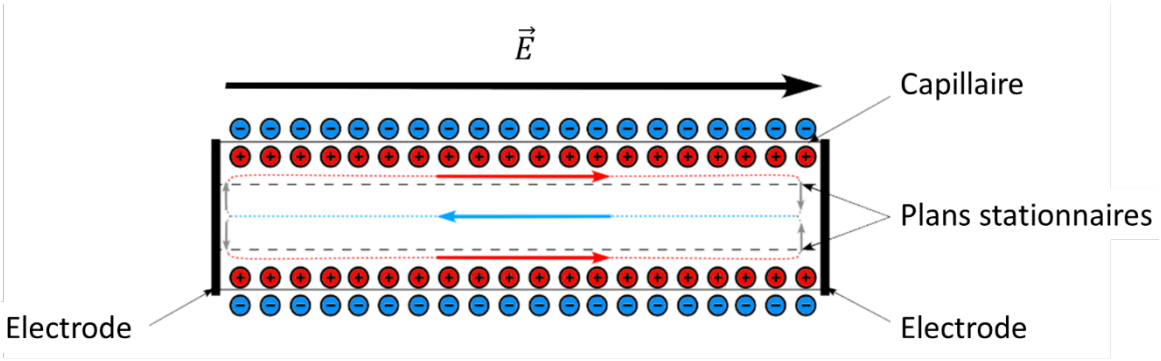


Figure 29 : Flux de liquide contenu dans un capillaire sous l'action d'un champ électrique $\vec{E}$ (adapté de Merlin 2012; Présent 2018).

Il est à noter que la mobilité électrophorétique des particules molles ne dépend pas uniquement de la densité de charges mais également de leur distribution spatiale, de leur dimension, de leur forme, de leur concentration en solution, et de la composition du milieu dans lequel elles évoluent (Duval and

Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Francius *et al.* 2011; López-León *et al.* 2005; Moussa *et al.* 2015; Ohshima 1995; Pagnout *et al.* 2012; Tseng *et al.* 2015). Enfin, pour obtenir des informations sur les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques des particules, le modèle physique analytique d'Ohshima (Ohshima 1995) est sélectionné. Ce modèle permet d'accéder à la densité volumique de charge ρ_0 (mol.m^{-3}) et à la longueur de pénétration hydrodynamique du fluide dans la couche molle $1/\lambda_0$ (m). Ce modèle est présenté dans le **chapitre 3,** dans le corps de l'article.

La caractérisation électrocinétique des bactéries, et des systèmes binaires NPs/bactéries, est réalisée à l'aide un Zetaphorémètre IV (CAD Instrumentation® France). La suspension bactérienne ou la suspension NPs/bactéries est injectée dans un capillaire en quartz de $2 \times 5 \times 75$ mm entre deux électrodes en palladium. Un champ électrique de 800 V.m^{-1} est imposé pour induire la migration des colloïdes et une caméra *Charge-Coupled Device* (CCD), montée sur un microscope, envoie les informations au logiciel ZetaCompact 5.01 (CAD Instrumentation®). Pour éviter une polarisation des électrodes, le champ électrique appliqué est inversé à une reprise pendant la mesure. Le logiciel fournit une distribution de mobilité pour chaque mesure, avec un maximum de trajectoires considérées de 200. Au minimum 30 trajectoires sont nécessaires pour garantir la fiabilité de la mesure (CAD Instrumentation 2006). Chaque mesure est répétée 3 fois.

Concernant les mesures de mobilité électrophorétique sur des systèmes binaires NPs/bactéries, le zetaphorémètre est privilégié car on s'intéresse en premier lieu à la signature électrocinétique des cellules bactériennes. De plus, les *E. coli* mesurant entre 2 et 3 µm de longueur, l'utilisation du zetaphorémètre pour déterminer leur mobilité électrophorétique est tout indiquée, car il permet de considérer des particules d'une taille comprise entre 0,1 à 50 µm.

Pour les mesures de mobilité électrophorétique des NPs seules, le Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments®) est utilisé. En effet, il est adapté pour des particules d'une taille comprise entre 5 nm et 10 µm. Le principe fondamental de la mesure de la mobilité électrophorétique utilisé par le Zetasizer est celui de l'électrophorèse. Le capillaire est en forme de U, de 6 cm de longueur et de 2 mm de rayon, et le champ électrique imposé est de 25 V.cm^{-1}.

Pour déterminer la mobilité électrophorétique de suspensions colloïdales chargées, Malvern Instruments® a développé une technique appelée M3-PALS, M3 signifiant *Mixed Mode Measurement* ou Mode de Mesure Mixte, qui permet de s'affranchir de l'électro-osmose. Il s'agit d'une combinaison de la vélocimétrie laser à effet Doppler (VLD) et de l'analyse de phase de la diffusion de la lumière (*Phase Analysis Light Scattering* ou PALS). Ainsi, un laser d'une fréquence connue est dirigé sur les particules en suspensions. La lumière diffusée par ces particules à un angle de 17° est combinée avec le laser de référence. La vitesse des particules est mesurée à partir du décalage de phase entre la

lumière diffusée par les particules en mouvement et le laser de référence. Le Mode de Mesure Mixte consiste à inverser le champ électrique appliqué entre les deux électrodes de deux manières différentes, rapide et lente, et d'effectuer une mesure de la mobilité électrophorétique pour chacune de ces inversions. Lors de l'inversion rapide du champ, les particules atteignent leur vitesse limite et le flux électro-osmotique est négligeable, signifiant que la mobilité mesurée est uniquement due à l'électrophorèse. La mesure est effectuée au centre de la cellule. L'inversion lente du champ ($t = 1s$) est appliquée dans le but de réduire la polarisation des électrodes. Les valeurs de mobilité sont plus précises mais elles sont modifiées du fait de l'électro-osmose. Une valeur de courant électro-osmotique est ensuite déterminée à partir des mesures lors de l'inversion rapide et de l'inversion lente. Les valeurs de mobilité obtenues lors de l'inversion lente sont normalisées par rapport à la valeur du courant électro-osmotique (Malvern Instruments Limited 2012).

2. Etude des systèmes simples de particules seules (bactéries ou NPs)

2.1 Préparation des batchs de bactéries

Le Zetaphorémètre IV est utilisé pour les mesures de mobilité électrophorétique des souches bactéries Nue (2152), pili-F (2302) et YeeJ (2551), en fonction de la concentration en KNO_3 du milieu de suspension et aux pH 3 et 7.

Les cultures bactériennes sont centrifugées à 5000×g pendant 5 min et re-suspendues ensuite dans 2 mL de KNO_3 10 mM. Une dilution est effectuée pour diminuer la DO_{600} à 0,2 et 8 mL de la culture diluée sont ajoutés à chaque batch de 80 mL, ces batchs correspondant à chacune des forces ioniques étudiées. La DO_{600} finale de chaque batch est donc de 0,02. Les volumes d'EUP (noté X dans le **Tableau 3** et la **Figure 30**) et de KNO_3 2M (noté Y dans le **Tableau 3** et la **Figure 30**) à additionner pour constituer ces batchs sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Composition des batchs de 80 mL pour l'étude du comportement électrocinétique des bactéries selon différentes forces ioniques

Concentration finale KNO_3 (mM)	1	2,5	5	10	25	50	100	250
Volume Y KNO_3 2M ajouté (mL)	0	0,06	0,16	0,36	0,96	1,96	3,96	9,96
Volume X EUP ajoutée (mL)	72,00	71,94	71,84	71,64	71,04	70,04	68,04	62,04
Volume de solution bactérienne DO_{600} = 0,2 [KNO_3] = 10 mM (mL)	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Volume final des batchs (mL)	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
DO_{600} finale	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Les volumes de KNO_3 2M à ajouter sont calculés à partir de l'**équation 8**.

$$FI_f = \frac{FI_{bact} \times V_{bact}}{V_f} + \frac{FI_{KNO_3 2M} \times V_{KNO_3 2M}}{V_f}$$
$$V_{KNO_3 2M} = \frac{V_f \times FI_f - FI_{bact} \times V_{bact}}{FI_{KNO_3 2M}} \quad \textbf{(8)}$$

Avec FI_f la force ionique finale de la solution (M), FI_{bact} , la force ionique de la solution bactérienne (M), V_{bact} le volume de bactéries ajoutées (mL), V_f le volume de la solution finale (mL), $FI_{KNO3\ 2M}$ la force ionique de la solution de KNO_3 2M (M), et $V_{KNO_3\ 2M}$ le volume de solution KNO_3 2M à ajouter (mL).

Après 15 min d'agitation, et l'ajustement du pH à l'aide de HNO_3 ou KOH 10^{-1} ou 10^{-2} M, les mesures de mobilité électrophorétique sont effectuées à trois reprises pour s'assurer de la répétabilité des mesures. Les différentes étapes sont résumées en **Figure 30**.

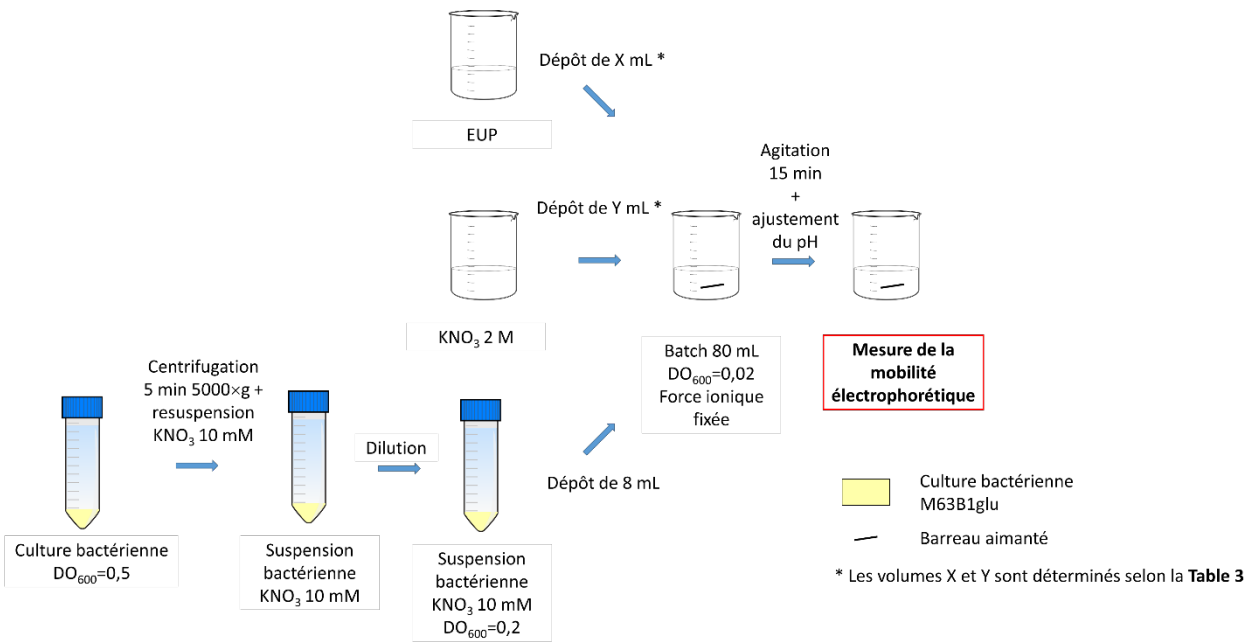


Figure 30 : Protocole de préparation des batchs de bactéries pour la mesure de mobilité électrophorétique

2.2 Préparation du batch de nanoparticules

Les batchs de SiNPs sont réalisés de la même manière que pour les mesures de taille dans la partie **0.2**.

3. Etude des systèmes binaires NPs/bactéries

L'étude des systèmes binaires SiNPs/bactéries a été effectuée à une force ionique de 1 mM à pH 7 et 2 mM à pH 3. La concentration en KNO_3 était initialement de 1 mM, mais la quantité de HNO_3 nécessaire à l'ajustement du pH à 3 a pour conséquence d'augmenter la force ionique de la solution. La gamme de concentration de SiNPs (NH_2 ou COOH) au contact des bactéries est : 0, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, $2{,}5\times10^{-3}$, 5×10^{-3} et 10^{-2} $g.L^{-1}$. Les souches bactériennes ayant été mises en contact avec les NPs sont la souche Nue (2152), la souche pili-F (2302) et la souche YeeJ (2551). La DO_{600} finale de la solution est de 0,02.

Les cultures bactériennes sont centrifugées à 5000×g pendant 5 min et re-suspendues ensuite dans 2 mL de KNO_3 1 mM. Une dilution est effectuée pour descendre la DO_{600} à 0,2 puis 1,4 mL de la culture diluée sont ajoutés à 12,6 mL de solution de KNO_3 1 mM, et la solution est mise sous agitation pendant 5 min. Le pH de la solution de KNO_3 a été préalablement ajusté à 3 ou 7 à l'aide de HNO_3 ou KOH 10^{-1} ou 10^{-2} M. Dans un second bécher, en fonction de la concentration de NPs souhaitée, un volume de solution de NPs à 0,1 $g.L^{-1}$ est versé dans une solution de KNO_3 1 mM, en agitation, selon la concentration finale souhaitée. La solution de NPs est ensuite versée dans la solution de bactéries en agitation, de manière à atteindre un volume final de 28 mL. Le détail des volumes des différentes solutions est disponible dans le **Tableau 4**. Le pH est ajusté si nécessaire et il a été décidé de laisser les

cellules bactériennes en présence des NPs pendant 15 min. En effet, l'objectif de l'utilisation de l'électrophorèse est de tester sa capacité de détection des modifications physico-chimiques de la surface des particules considérées, par le biais de signatures électrocinétiques, lors des premiers stades d'interactions entre NPs et bactéries. Les différentes étapes du protocole sont résumées en **Figure 31**.

Tableau 4 : Détails de la préparation des suspensions utilisées pour les mesures de mobilité électrophorétiques sur des systèmes binaires NPs/bactéries.

	Bactéries seules	**Mélanges NPs/bactéries**						**NPs seules**
Concentration finale en NPs ($g.L^{-1}$)	0	$1,00\times10^{-5}$	$1,00\times10^{-4}$	$1,00\times10^{-3}$	$2,50\times10^{-3}$	$5,00\times10^{-3}$	$1,00\times10^{-2}$	$1,00\times10^{-2}$
Volume X de la solution de NPs (mL) Solution mère à 0,1 $g.L^{-1}$ [KNO_3]=1 mM	0	$2,80\times10^{-3}$	$2,80\times10^{-2}$	$2,80\times10^{-1}$	$7,00\times10^{-1}$	1,40	2,80	2,80
Volume de KNO_3 1 mM ajouté (mL)	26,6	26,5972	26,572	26,32	25,9	25,2	23,8	25,2
Volume ajouté de suspension bactérienne (mL) DO_{600} = 0,4 KNO_3]=1 mM	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	0
Volume final des batchs (mL)	28	28	28	28	28	28	28	28
DO_{600} finale	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0

Les colonnes « bactéries seules » et « NPs seules » correspondent à la préparation de suspensions de systèmes « simples ». Les valeurs de mobilité électrophorétique obtenues servent de références lors de la comparaison des signatures électrocinétiques selon l'augmentation de la concentration en NPs.

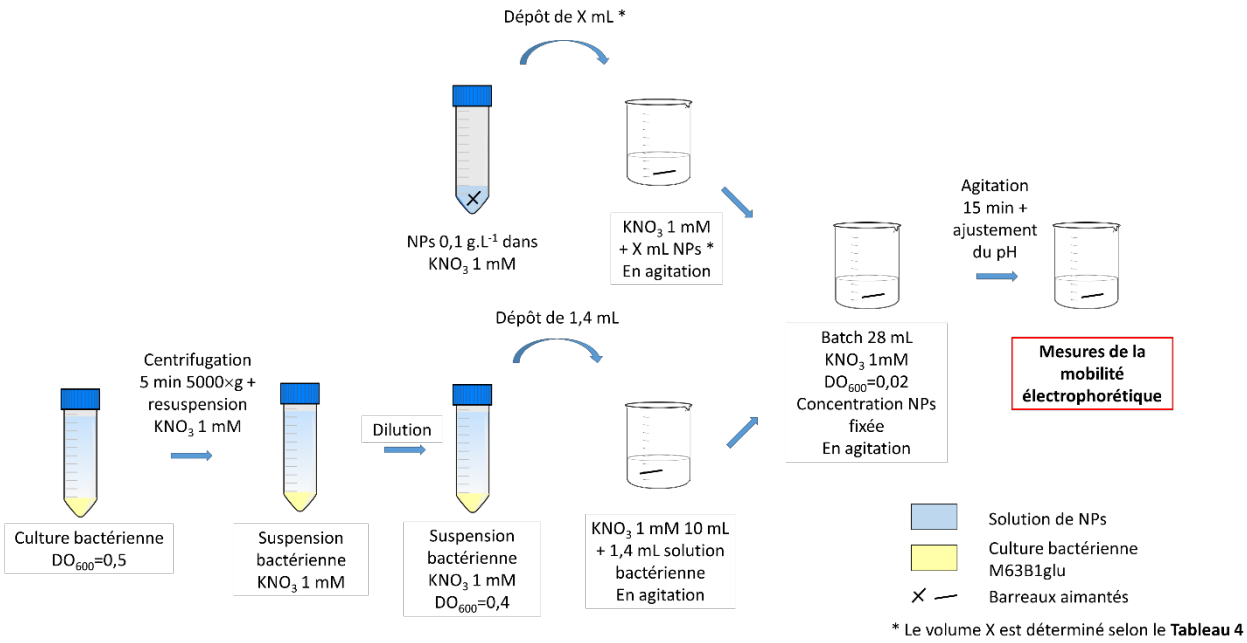


Figure 31 : Protocole de réalisation des batchs NPs/bactéries pour la mesure de mobilité électrophorétique

V. Préparation des biofilms

Dans cette étude, le temps de culture des biofilms a été établi à 24 h. Ces biofilms ont été formés en conditions statiques à 37°C dans des microplaques 96 puits à fond en verre, ou dans des dishes à fond en verre, dans du milieu minimum M63B1glu à pH 7.

1. Formation d'un biofilm bactérien en microplaque

Afin de déterminer quelles souches bactériennes sont capables de produire un biofilm, selon leurs appendices de surface exprimés, des tests préalables ont été effectués dans des microplaques stériles 96 puits avec couvercle, à fonds plats en verre (Falcon®). Les différentes étapes de ce protocole sont résumées en **Figure 32**.

Ainsi après l'étape de 2ème pré-culture, la solution bactérienne est diluée au 100ème dans du M63B1glu, puis 100 µL sont déposés dans les puits. Certains puits sont remplis de milieu de culture sans bactéries, et d'autres puits sont laissés volontairement vides pour s'assurer de la non-contamination de la plaque, et du milieu de culture utilisé. Après 24 h à 37 °C en étuve, le surnageant est enlevé et la microplaque est rincée à 3 reprises dans de l'EUP. Ensuite, 125 µL d'une solution de cristal violet diluée à 1 % en volume dans de l'EUP sont déposés dans les puits de la microplaque. Après 15 min d'attente, la microplaque est à nouveau rincée à 3 reprises dans de l'EUP.

Le cristal violet a pour effet de colorer les composants cytoplasmiques de la bactérie (Beveridge and Davies 1983; Feoktistova *et al.* 2016; Jackson *et al.* 2002). Si une coloration au cristal violet persiste dans les puits, après les étapes de rinçage, cela signifie la présence de biofilm, attaché au substrat en verre. Cependant, le cristal violet détruit les cellules bactériennes, il s'agit donc d'un test destructif ayant pour unique but de constater qualitativement la croissance de biofilms. Le contenu des puits colorés en violet est re-suspendu avec une solution composée à 80 % d'éthanol et à 20 % d'acétone, pour diluer les biofilms et mesurer la DO. Du fait de la coloration violette de la solution de cristal violet diluée, il est nécessaire de mesurer la DO à 570 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance du spectre du cristal violet. La DO_{570} est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques.

Il est également possible de mesurer la DO_{600} de bactéries mises en culture selon les mêmes conditions, mais sans la coloration au cristal violet. Pour cela il est nécessaire de re-suspendre le contenu des puits dans de l'EUP, afin d'avoir le volume minimum nécessaire pour permettre la mesure de la DO_{600} par le spectrophotomètre.

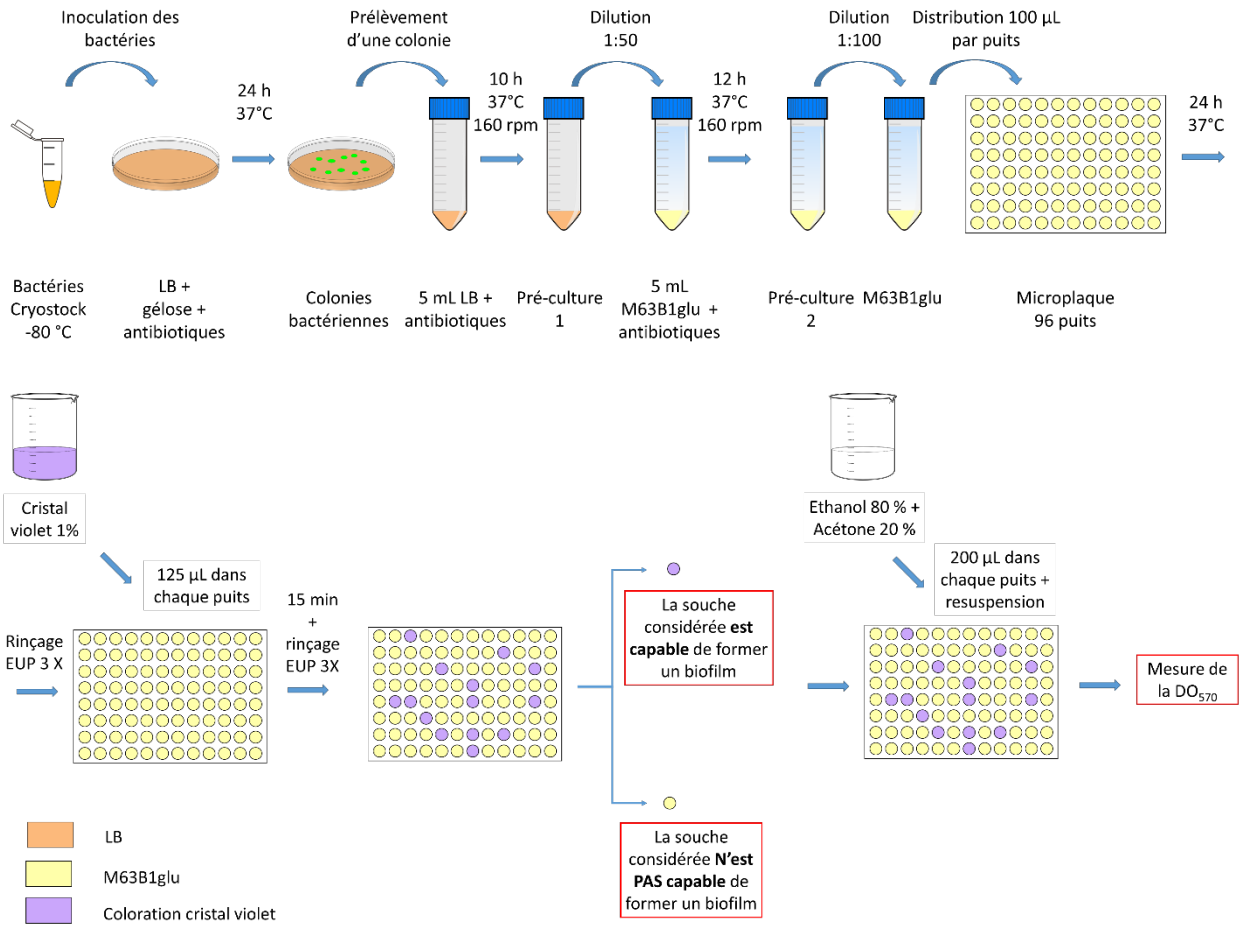


Figure 32 : Protocole de réalisation de biofilms en microplaques 96 puits et tests au cristal violet

2. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre

Afin de mesurer la DO_{600} et la DO_{570} dans les puits de la microplaque 96 puits, un spectrophotomètre à microplaques FLX-Xenius XC (SAFAS® Monaco) et le logiciel associé SP2000 sont utilisés (SAFAS Monaco 2015). Le principe de fonctionnement de cet appareil est le suivant. Les photons émis par la source lumineuse du spectrophotomètre excitent les électrons des molécules constituant l'échantillon. Si l'énergie du photon est suffisante pour causer une transition électronique, le photon est absorbé par la molécule. Le faisceau lumineux voit alors son intensité diminuer, et c'est avec cette diminution d'intensité que l'on peut accéder à l'absorbance de l'échantillon. La longueur d'onde de la lumière émise est à adapter selon l'absorbance de la solution à considérer. La loi de Beer-Lambert montre que l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration ou à la DO (**Equation 9**).

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l C \qquad \textbf{(9)}$$

Avec A l'absorbance à une longueur d'onde λ donnée, ε le coefficient d'absorption molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ a une longueur d'onde donnée également, l la longueur du trajet optique en cm et C la concentration de la solution en $mol.L^{-1}$.

3. Formation d'un biofilm bactérien en dish

Une fois les souches formant des biofilms mises en évidence, les biofilms sont réalisés sur des dishes dans le but d'être observés par microscopie. Des dishes particulières ont été utilisées pour l'observation des biofilms par holotomographie. Il s'agit de tomodishes (Tomocube®), de 50 mm de diamètre, présentant une zone carrée centrale en verre de dimensions 20×20 mm d'une épaisseur #1.5 où l'échantillon à observer doit être placé (**Figure 33**). Le biofilm est développé sur cette zone carrée. Une lamelle en verre d'épaisseur #1.5 et de dimension 25×25 mm est ensuite placée dans l'encoche prévue sur la tomodish.

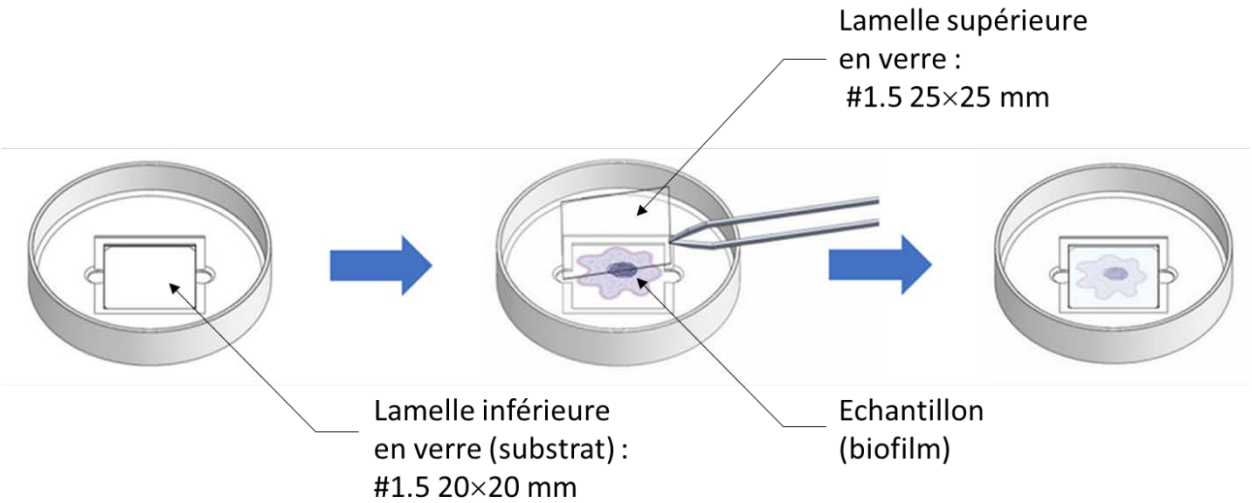


Figure 33 : Préparation pour observation de l'échantillon sur tomodish (adapté de Tomocube®, Inc)

Après l'étape de la 2ème pré-culture, la culture bactérienne est re-suspendue dans une solution de M63B1glu de telle sorte à ce que la DO_{600} finale soit de 0,01. Sont additionnés 600 µL de la culture à DO_{600}=0,01 et 400 µL de M63B1glu. La solution bactérienne de 1 mL obtenue est ensuite déposée au centre de la dish. Pour éviter le dessèchement du biofilm, la dish est ensuite scellée avec du parafilm® puis déposée au centre d'une boîte de Pétri. Sur un bord de cette dernière est déposé un coton stérile imbibé d'EUP stérile. La boîte de Pétri est à son tour scellée, puis mise à l'étuve à 37°C pour 24 h. Au bout de 24 h, le surnageant du biofilm est retiré précautionneusement, puis le biofilm est rincé à 3 reprises avec une solution de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sans calcium et sans magnésium. Après

l'étape de rinçage, il est nécessaire de déposer 50 µL de ce même PBS sur le biofilm pour éviter son desséchement. Les différentes étapes de ce protocole sont résumées en **Figure 34**.

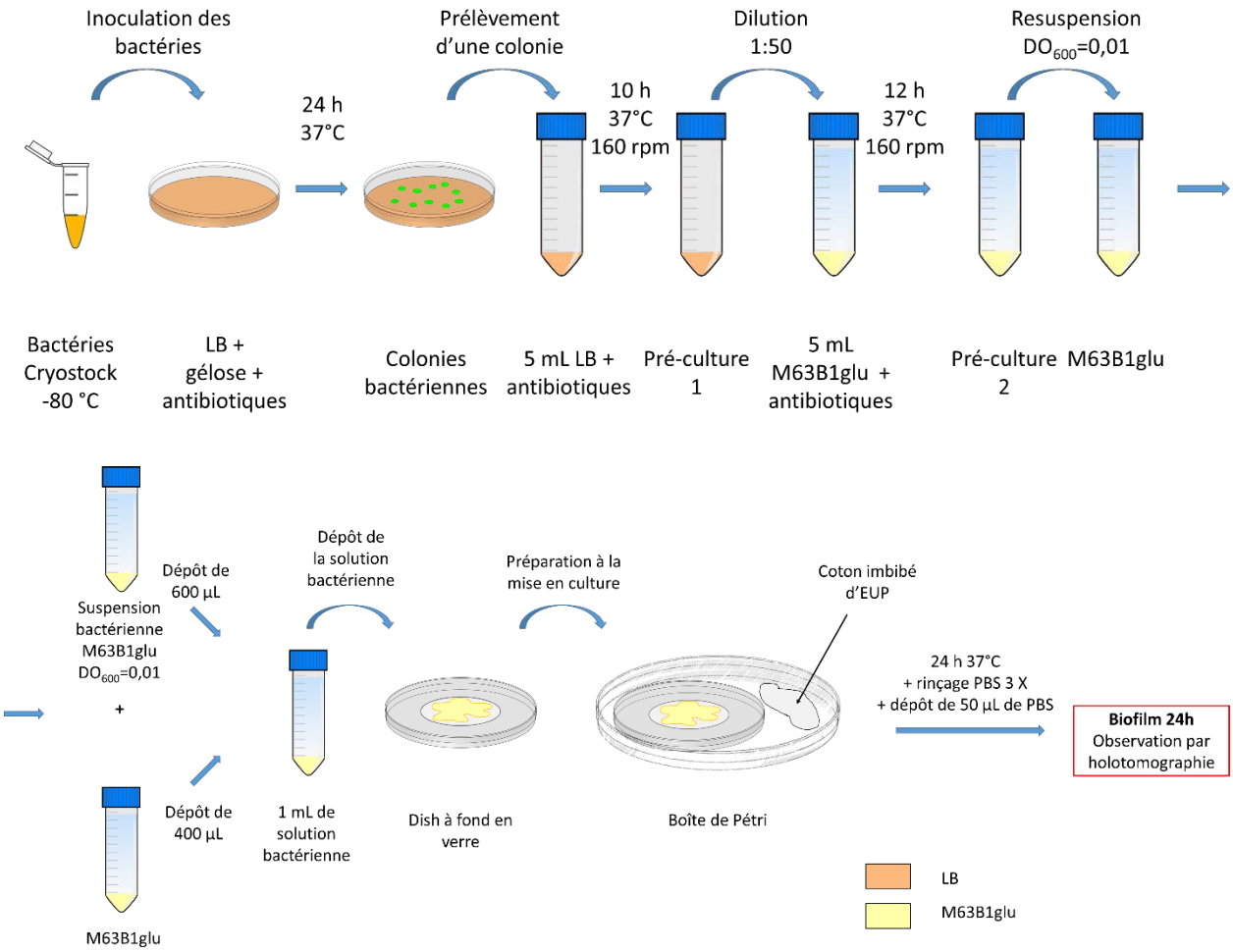


Figure 34 : Protocole de réalisation des biofilms bactériens sur dish

4. Formation d'un biofilm avec bactéries et NPs en dish

Pour la réalisation de biofilms avec des NPs, la 2ème pré-culture est également diluée jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,01. Ensuite, 600 µL de culture à DO_{600} = 0,01 sont additionnés avec les volumes X et Y de solutions de NPs et de M63B1glu selon le **Tableau 5**. L'ensemble est mis en agitation 15 min à 600 rpm. Les agitateurs ont été préalablement nettoyés avec du HNO_3 1 M, rincés à l'EUP puis autoclavés.

Tableau 5 : Volumes des solutions de SiNPs et de M63B1glu à ajouter à la solution bactérienne lors de la réalisation des biofilms.

Concentration finale ($g.L^{-1}$)	0,4	0,3	0,2	0,1
Volume prélevé (X) de solution SiNPs 1 $g.L^{-1}$ (µL)	400	300	200	100
Volume (Y) de M63B1glu ajouté (µL)	0	100	200	300
Volume de culture ajouté DO_{600}=0,01 (µL)	600	600	600	600

De même que pour le protocole de formation de biofilms bactériens, la solution NPs/bactéries est ensuite déposée au centre de la dish. Puis l'ensemble est scellé et mis en l'étuve 24 h à 37°C, rincé et préparé avec du PBS sans calcium et sans magnésium avant observation (**Figure 35**). L'étude des biofilms réalisés sera détaillée dans le **chapitre 4.**

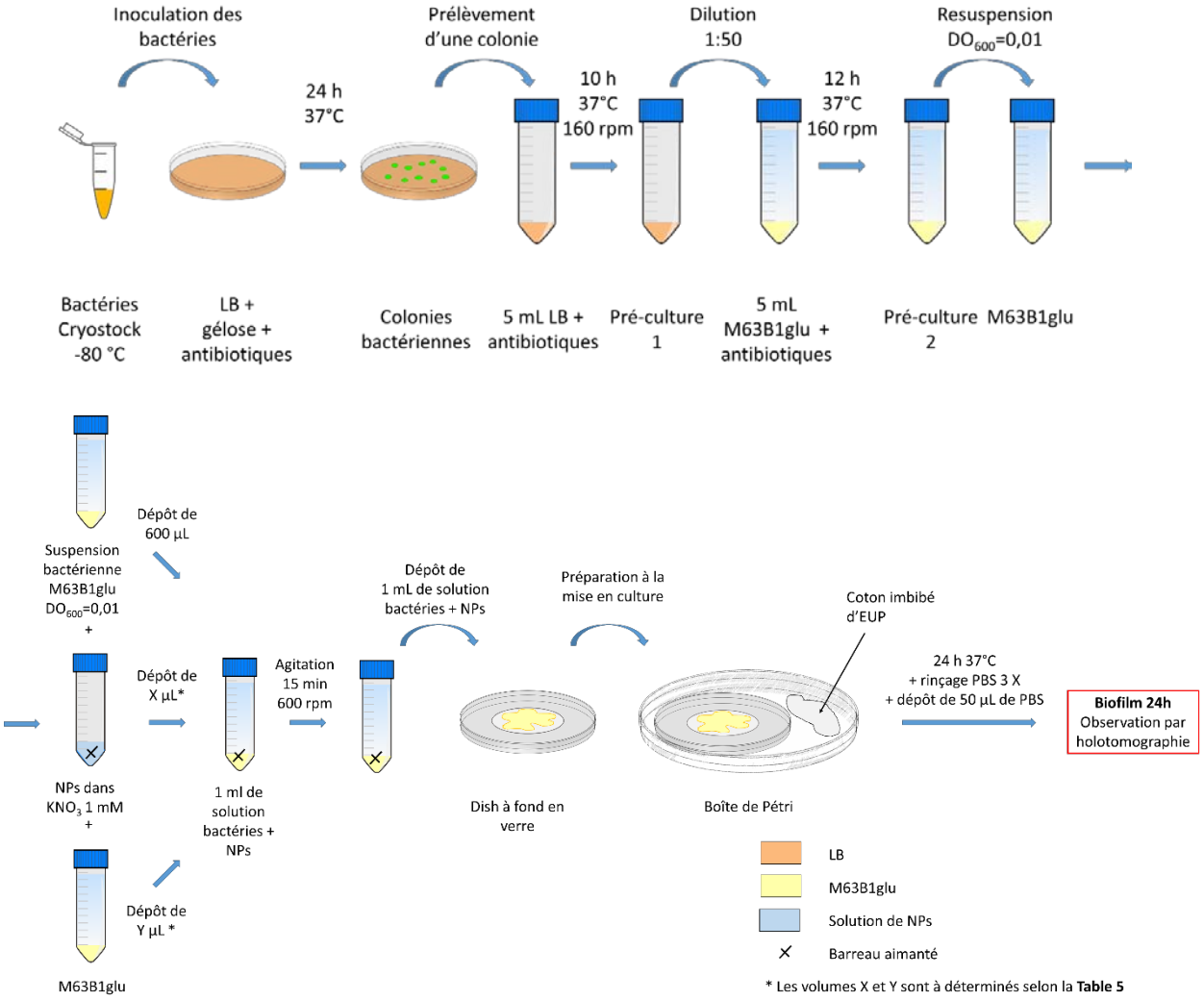


Figure 35 : Protocole de réalisation des biofilms NPs/bactéries sur dish

VI. L'holotomographie comme outil d'investigation de la structure des biofilms

L'holotomographie est une technique de microscopie combinant la tomographie et l'holographie. Cette technologie a pour but de permettre d'explorer les tissus vivants de façon quantitative, dynamique et non-invasive en cartographiant en 3D les indices de réfraction (RI) au sein des cellules. En effet, ces indices de réfraction permettent de déterminer les informations structurales des cellules vivantes sans utiliser d'agents de marquages exogènes (Lee *et al.* 2013b).

En détails, une onde est caractérisée par une amplitude et une phase (**Equation 10**) :

$$A(\vec{r},t) = \underbrace{A_M}_{\text{Amplitude}} \exp i\underbrace{\left(\omega t - \vec{k}\vec{r} + \varphi_0\right)}_{\text{Phase}} \quad \textbf{(10)}$$

, avec A_m correspondant à l'amplitude, et $\omega t - \vec{k}\vec{r} + \varphi_0$ correspondant à la phase de l'onde lumineuse, $\vec{r}$ est le vecteur position du point considéré, t correspond au temps, ω est la pulsation, φ_0 est la phase à l'origine, $\vec{k}$ est le vecteur d'onde dont la norme vaut $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, avec $\lambda = \frac{\lambda_0}{n}$ où λ_0 est la longueur d'onde dans le vide (m) et n est l'indice de réfraction du milieu.

La phase, en traversant un échantillon, est modifiée. Notamment, la longueur d'onde diminue car la lumière connaît un ralentissement en traversant un matériau, d'autant plus que l'indice de réfraction est important. Cela entraine un retard de phase de l'onde. La plupart des techniques de microscopie utilisées mesurent une intensité, reliée à l'amplitude de l'onde, qui ne contient pas d'informations concernant la phase de l'onde. L'holographie est une technique quantitative permettant d'accéder à cette phase, et ainsi aux indices de réfraction. Pour cela, un laser est dirigé sur l'échantillon. Il est divisé de telle sorte que seule une partie de ce laser traverse l'échantillon. Les deux faisceaux sont mis en interférence, et un hologramme est mesuré sur la caméra associée. A partir de cet hologramme, il est possible de recalculer l'amplitude et la phase, et ainsi d'accéder aux indices de réfraction, mais uniquement pour une surface en 2D. Avec l'holotomographie, pour accéder à la cartographie en 3D des indices de réfraction de l'échantillon, le faisceau laser tourne autour de ce dernier et un hologramme 2D est mesuré pour chacune des positions du faisceau, et donc à différents angles d'éclairage. L'empilement de ces hologrammes 2D, avec l'amplitude et la phase, permet de recalculer un volume 3D des indices de réfraction (**Figure 36**).

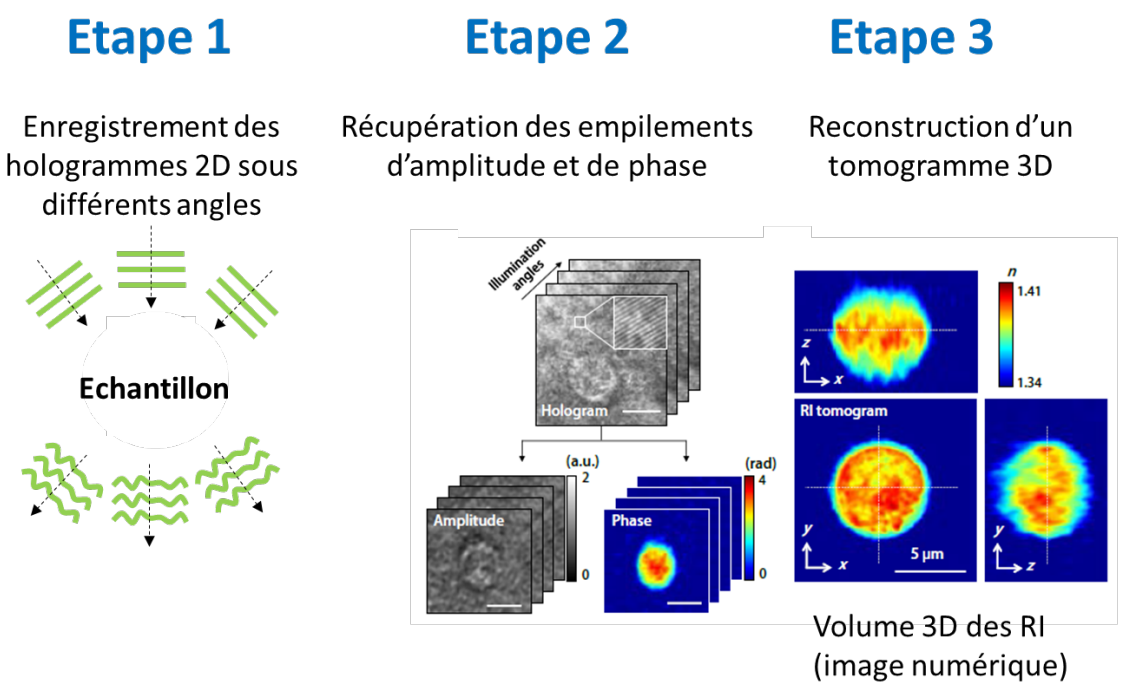


Figure 36 : Principe de la reconstruction d'un volume 3D d'indices de réfraction avec l'holotomographie. Adapté de Yoon *et al.* 2015.

Un algorithme basé sur la diffraction de Fourier permet de transposer les images 2D vers une image 3D. Ensuite, la transformée de Fourier inverse est appliquée pour obtenir une distribution 3D des indices de réfraction. L'image obtenue est donc une image numérique. Les détails concernant les algorithmes utilisés et l'holotomographie sont disponibles dans (Kim *et al.* 2016a; Lee *et al.* 2019, 2013a; Yoon *et al.* 2017).

A ce jour, il existe deux constructeurs commercialisant des holotomographes, Nanolive® et Tomocube®. Nous avons eu l'opportunité de tester les deux appareils, mais seuls les résultats obtenus avec l'holotomographe de Tomocube® seront présentés dans le **chapitre 4**.

L'appareil de Tomocube® (**Figure 37**) est constitué d'un condenseur et d'un objectif à grossissement ×60 entre lesquels l'échantillon à observer est placé. Il est éclairé selon un angle de 53 ou 63°, par un faisceau laser émettant à 532 nm, passant par un jeu de miroirs, et tournant à 360° autour de l'axe optique. Le logiciel associé est Tomostudio®.

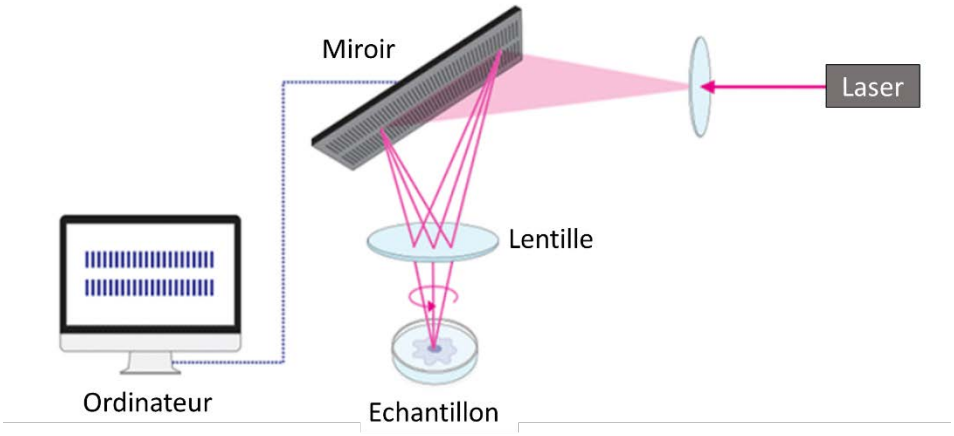


Figure 37 : Principe de fonctionnement de l'holotomographe de Tomocube® (adapté de Tomocube®)

A titre de comparaison, l'appareil de Nanolive® (**Figure 38**), à la différence de celui de Tomocube®, n'a pas de condenseur, ce qui permet d'observer des échantillons plus larges. Dans cette configuration, c'est le miroir qui fait tourner le laser autour de l'échantillon. L'holotomographe de Nanolive® est équipé d'un objectif à grossissement ×60, le laser émet à 520 nm et le logiciel associé est Steve®.

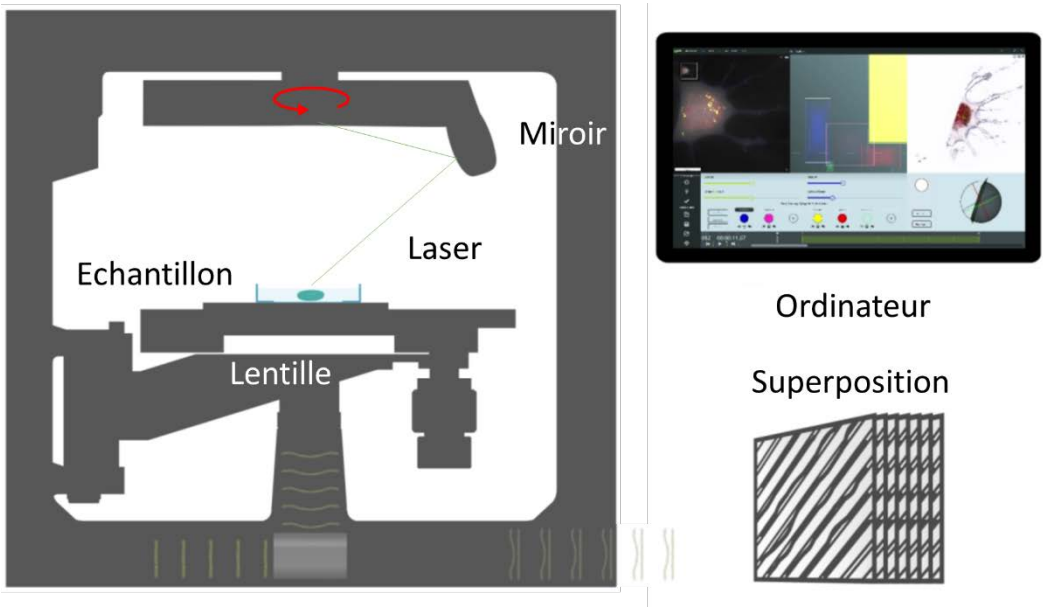


Figure 38 : Principe de fonctionnement de l'holotomographe de Nanolive® (adapté de Nanolive®)

Dans le **chapitre 4**, sont présentés les résultats obtenus avec l'holotomographe de Tomocube® sur des biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) et générés en présence de NPs $SiNH_2$ ou SiCOOH à une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$. Un script Matlab a été développé afin d'exploiter les images numériques 3D et de déterminer plusieurs paramètres de caractérisation de la structure du biofilm. La procédure de

traitement des images ainsi que l'explication de l'obtention des différents paramètres de caractérisation sont également détaillées dans ce chapitre.

A l'issue des tests de formation des biofilms effectués sur les 8 types de souches, seules 3 d'entre elles se sont avérées former des biofilms : les souches s*trong biofilm former* E751, souche contrôle de la formation des biofilms du fait de la pluralité de ses appendices de surface (fimbriae type I, pili-F et protéine surfacique Ag43), YeeJ (E2551) et la pili-F (E2302). Les appendices de surface présentés par la souche E751 sont trop diversifiés pour permettre d'isoler leur influence respective sur les interactions des bactéries avec les NPs ou sur la construction du biofilm. Elle n'a donc pas été incluse dans les études menées durant cette thèse.

Ainsi, dans le **chapitre 3** ayant pour objectif de mettre en avant l'électrophorèse comme méthode de détection des actions des NPs en fonction du pH et des biostructures surfaciques bactériennes, les souches E2551 et E2302 ont été sélectionnées. La souche nue (E2152) est également incluse dans cette étude en tant que souche contrôle de l'incidence de la présence des appendices sur les interactions bactéries/NPs.

Dans le **chapitre 4** ce sont les biofilms issus de la bactérie YeeJ (E2551) qui sont étudiés, car il s'agit de la seconde souche la plus apte à former des biofilms, après la E751.

Chapitre 3 : L'électrophorèse comme méthode simple de détection des actions délétères de nanoparticules manufacturées sur des cellules vivantes

Présentation de l'article 103

Electrophoresis as a simple method to detect deleterious actions of engineered nanoparticles on living cells 106

Expérimentations complémentaires 144

Présentation de l'article

Suite au développement considérable des NPs manufacturées et de leur utilisation dans de nombreux domaines (Buzea *et al.* 2007; Svenson 2009; Vidic 2013), il est nécessaire de comprendre leur devenir au sein de l'environnement. Il a d'ores-et-déjà été prouvé que les bactéries présentes dans les compartiments biotiques sont affectées par la présence des NPs (Yang *et al.* 2013; El Badawy *et al.* 2011; Choi *et al.* 2010; Stoimenov *et al.* 2002; Ikuma *et al.* 2015).

Les interactions entre NPs et bactéries peuvent être de différents types (i.*e.* van der Waals, électrostatiques, stériques, hydrophobes, clé-serrure) et sont reliées aux propriétés physico-chimiques des NPs (*e.g.* taille, charge) et des bactéries (*e.g.* structure de la paroi, nature des appendices surfaciques) (Beaussart *et al.* 2018a; Jacobson *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2010; Monopoli *et al.* 2012).

Ainsi, ce chapitre a pour but de déterminer l'influence des biostructures pariétales de bactéries *E. coli* et des groupements surfaciques $–NH_2$ de NPs de silice sur les interactions NPs/bactéries. Pour cela sont détectées les modifications structurales bactériennes induites par les NPs dans le cas d'interactions attractives. Il existe des techniques pour observer les bactéries à l'échelle de la cellule unique comme le MET ou l'AFM, ce dernier permettant également de mesurer les interactions entre NPs et bactéries. Cependant, dans une volonté de déterminer les effets des NPs sur les bactéries à l'échelle de la solution, il a été décidé d'utiliser l'électrophorèse, une technique facile d'accès et peu coûteuse. Ainsi, l'électrophorèse a été choisie avec l'objectif de détecter les signatures électrophorétiques au sein de systèmes binaires NPs/bactéries, ces signatures témoignant de l'action des NPs sur les bactéries.

Dans un premier temps ont été caractérisés, à différents pH et sur une gamme de force ionique, les comportements électrophorétiques des NPs $SiNH_2$ et des 3 souches bactérienne *E. coli* sélectionnées : une souche nue (E2152), une souche présentant une protéine surfacique YeeJ (E2551) et une souche arborant des pili-F (E2302). Pour replacer dans le contexte de la thèse, sur les 8 souches sélectionnées initialement (***cf.* Chapitre 2 § I.1**), les souches YeeJ (E2551) et pili-F (E2302) ont été choisies car ce sont celles qui forment le mieux des biofilms (***cf.* Chapitre 4 I.**) tout en arborant un seul type de biostructure surfacique différent. La souche nue (E2152) intervient en tant que contrôle, pour constater l'influence des biostructures surfaciques sur le comportement électrophorétique des bactéries en présence ou non de NPs.

Dans ce chapitre, il est montré que les bactéries sont chargées négativement, comme attendu, et que la charge surfacique des NPs est inversée entre les pH 5 et 6. Ainsi, il a été décidé d'étudier l'influence de la présence des NPs $SiNH_2$ sur les propriétés électrocinétiques des cellules à pH 7, où les NPs sont

chargées négativement, et pH 3, où les NPs sont chargées positivement. Par ailleurs, l'application du modèle physique analytique d'Ohshima, pour l'étude de l'électrocinétique des particules molles, rend compte d'une non-idéalité de la surface des NPs du fait de la présence des groupements terminaux. Il a également été constaté que la présence de biostructures surfaciques influe sur la charge des bactéries, de même que le pH et la force ionique du milieu dans lequel elles sont dispersées (Francius *et al.* 2011; Duval and Gaboriaud 2010; López-León *et al.* 2005; Ohshima 1995; Pagnout *et al.* 2012). A partir de la caractérisation électrocinétique des systèmes isolés bactéries ou NPs, selon leur pH des interactions électrostatiques sont déjà pressenties au regard de leur charge respective.

Dans un second temps, pour l'observation des comportements électrophorétiques des systèmes binaires, une représentation originale de la distribution de la mobilité électrophorétique μ en fonction de la concentration en NPs a été choisie. Cette représentation est dénommée « plume » dans le corps de l'article. Ainsi, les déformations de ces plumes apportent des informations sur les modifications induites par les interactions NPs/bactéries. L'étude de la mobilité électrophorétique des systèmes binaires a été menée aux pH 7 et 3 pour une force ionique de 1 mM à pH 7 et de 2 mM à pH 3. La concentration en NPs a été variée de 10^{-5} à 10^{-2} $g.L^{-1}$. A pH 7 aucune modification ne dénotant des interactions n'est notable, hormis avec la souche pili-F (E2302). Il semblerait que cela soit dû à la présence de pili-F permettant de passer outre la barrière d'énergie répulsive entre les bactéries et les NPs. Les NPs sont alors piégées par les pili-F. A pH 3, les comportements électrophorétiques sont différents. Les plumes sont altérées, mais la concentration en NPs qui implique cette modification diffère d'une souche bactérienne à l'autre. Ainsi, la souche YeeJ (E2551) semble être la plus touchée par la présence de NPs. Par ailleurs, un décalage de la mobilité électrophorétique des NPs peut s'expliquer par l'acquisition par les NPs d'une bio-couronne protéique.

Les observations menées à l'aide de l'électrophorèse ont permis de mettre en évidence des comportements caractéristiques à l'échelle de la solution. Il a donc été décidé d'observer les conséquences de la présence de ces NPs à l'échelle de la cellule unique au moyen de l'AFM. L'application d'une méthode de détermination de la rugosité de surface par l'application d'un filtre gaussien, ainsi que l'observation de la morphologie de la surface cellulaire a permis de montrer qu'à pH 7, les NPs tendent à lisser la surface des bactéries présentant des biostructures surfaciques. Par ailleurs, il apparaît que la combinaison d'un pH acide et de la présence de NPs modifie la surface des bactéries YeeJ (E2551). Cela se traduit par l'apparition de cratères, probablement causés par des impacts de NPs, et de sphéroïdes pouvant correspondre à des vésicules de la membrane externe, que les NPs peuvent abraser.

Ainsi, cette étude met en évidence l'utilité de l'électrophorèse pour détecter les modifications des propriétés physico-chimiques de surfaces des bactéries lors de leurs premiers stades d'interactions avec les NPs.

Afin de tester l'efficacité de l'électrophorèse comme méthode de détection des modifications structurales dues aux interactions NPs/bactéries, un autre système binaire a été considéré. Ce dernier est constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH, dans une solution de force ionique en KNO_3 de 1 mM et à pH 7. Ces résultats complémentaires sont décrits après l'article.

Electrophoresis as a simple method to detect deleterious actions of engineered nanoparticles on living cells

Elise Vouriot,[a] Isabelle Bihannic,[a,⊥] Audrey Beaussart, [a,⊥] Yves Waldvogel,[a] Angelina Razafitianamaharavo,[a] Tania Ribeiro,[b] José Paulo S. Farinha,[b] Christophe Beloin,[c] Jérôme F.L. Duval[a,*]

[a] Université de Lorraine, CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.
[b] Centro de Química-Física Molecular and IN - Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Instituto Superior Técnico, University of Lisbon, 1049-001, Lisboa, Portugal.
[c] Institut Pasteur, Unité Génétique des Biofilms, F-75724 Paris 15, France.

[⊥] These authors equally contributed to this work.
[*] Corresponding author: jerome.duval@univ-lorraine.fr

Abstract:

The release of engineered nanoparticles (NPs) in the environment may have profound implications for the health of aquatic biota. In this study, we evidence that the initial stage of NPs action on bacteria can be detected upon measurement of the electrophoretic fingerprints of mixed NPs-cells dispersions. Such electrokinetic signatures reflect a modification of the physicochemical cells and NPs surface properties following changes in cell envelope organization, subsequent intracellular material release and/or biomolecules cell excretion. The demonstration is based on a thorough investigation of the electrohydrodynamic features of genetically engineered *Escherichia coli* bacteria exhibiting distinct surface phenotypes (presence of adhesive YeeJ large proteins or F-pili proteinaceous filaments) exposed to silica NPs (65 nm radius) functionalized by $-NH_2$ terminal groups. At pH 7, electrostatics prevents interactions between bacteria and $SiNH_2$ NPs, regardless of the NPs concentration considered ($0\text{-}10^{-2}$ g L^{-1} range). At pH 3, electrostatically-driven interactions allow intimate contacts between NPs and bacteria. In turn, significant modulation of the electrophoretic determinants of cells and NPs are generated due to cells envelope alteration and bio-corona acquisition by NPs. Differentiated roles of the cell surface appendages in the mediation of NPs impacts are evidenced by the measured dependence of electropherograms on cell surface phenotype and NPs concentration. Cell morphology and surface roughness, evaluated by Atomic Force Microscopy (AFM) in liquid, confirm the pH and NPs concentration conditions where NPs-cells interactions are operational. Combination of electrokinetics

35 and AFM further pinpoints heterogeneities in cells response at the single cell and population scales.
36 Altogether, results show that electrokinetics is suitable to detect the preliminary stage of events
37 leading to NPs toxicity toward microorganisms.

38 **Environmental context:**

39 Attractive interactions and subsequent contacts between NPs and microorganisms are the first steps
40 of a chain of events leading to adverse NPs effects toward cells. Herein we show that the
41 electrophoretic response of complex mixtures of engineered NPs (silica NPs) and bacteria (*E. coli*)
42 reflects initial NPs-mediated cell surface damages. We thus provide a promising option for a rapid
43 electrokinetics-based detection of deleterious actions of NPs on biological cells.

44 ## 1. Introduction

45 Over the past decades, nanomaterials and related products have gained a prominent importance
46 in our everyday life. In particular, engineered nanoparticles (NPs) are now commonly used in various
47 industries such as food-processing, electronics or cosmetics as well as in numerous pharmaceutical
48 and biomedical applications (Ju-Nam and Lead 2008; Svenson 2009). NPs are released in the
49 environment and their dissemination may severely impact on the proper functioning of ecosystems.
50 For the sake of illustration, NPs are known to affect the speciation of essential trace metal elements
51 (Duval 2017), to disturb their biogeochemical cycling (Chai *et al.* 2015), to modify microbial diversity
52 (Yang *et al.* 2013), or to affect cells growth (El Badawy *et al.* 2011), cells viability (Choi *et al.* 2010;
53 Stoimenov *et al.* 2002) and cells ability to form biofilms (Ikuma *et al.* 2015; Neal 2008; Peulen and
54 Wilkinson 2011). These issues have motivated the scientific community to deploy important efforts for
55 investigating the mechanisms governing the interactions between NPs and bacteria at various spatial
56 scales (Beddoes *et al.* 2015; Choi *et al.* 2010; Shang *et al.* 2014), and for identifying implications in
57 terms of adverse outcome pathways and toxicity (Colvin 2004; Kleinstreuer *et al.* 2016; Moore 2006;
58 Velzeboer *et al.* 2008). Acquiring such basic knowledge is a mandatory condition for the elaboration of
59 environmental remediation strategies or the development of new industrial practice, *e.g.* the eco-
60 friendly design of novel nanoparticulate products (Ingale and Chaudhari 2013).

61 The magnitude and nature of the interactions operational between bacterial cells and NPs (steric,
62 electrostatic, van der Waals, hydrophobic and/or lock-and-key) are intimately connected to the
63 physicochemical composition and spatial organization of the cell envelope (Beaussart *et al.* 2018a;
64 Jacobson *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2010; Monopoli *et al.* 2012). The latter include differences in cell wall
65 structures (*e.g.* Gram+ *vs.* Gram- bacteria) (Beveridge and Graham 1991) or the presence of peripheral
66 appendages, *e.g.* fimbriae, pili, lipopolysaccharides or flagella that mediate cell resistance and binding

67 to NPs (Beaussart *et al.* 2018a; Jacobson *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2010; Mathelié-Guinlet *et al.* 2018).
68 Together with the defining physicochemical properties of NPs (*i.e.* NP size, charge, or
69 hydrophobic/hydrophilic balance), the physicochemical functionalities of cell envelopes determine
70 whether or not contact between cells and NPs takes place (Beaussart *et al.* 2018a; Beddoes *et al.* 2015;
71 Phillips *et al.* 2008; Thill *et al.* 2006). As such, the existence of NPs-cells attractive interactions is the
72 required condition for NPs to induce possible cell surface alterations, cell dysfunction and toxicity
73 effects (Choi *et al.* 2010; Hayden *et al.* 2012; Planchon *et al.* 2013). This situation obviously excludes
74 NPs whose action mode does not require any contact with- or binding to the biological target, *e.g.*
75 metallic NPs whose dissolution in aqueous media releases metal ions at the origin of adverse effects
76 on biota (Choi *et al.* 2010).
77
78 Various techniques may be employed for measuring the interactions between biological cells and
79 NPs, and/or evaluating their respective electrostatic surface properties. Among them, protolytic
80 titrations allow the determination of surface charges of biotic and abiotic colloids (Van Der Wal *et al.*
81 1997). Though robust for abiotic systems like NPs, in case of *e.g.* bacteria the method suffers from the
82 difficulty to discriminate between protons acting as charge determining-ions and protons that are
83 released or uptaken by cells for metabolic purpose. As an alternative, Atomic Force Microscopy (AFM)
84 now makes it possible to address the repartition of cell surface charges at the single cell level, or even
85 measure the governing interactions between a given bacterium and a single NP with diameter less
86 than 10 nm (Beaussart *et al.* 2018a). However, the inherent and obvious limit of such spatially-resolved
87 AFM-based studies is the possible analysis of a restricted number of cells only. Besides, in some cases,
88 the AFM probe jumps in contact with the investigated biosurface at sufficiently low separation
89 distances, which may render difficult any quantitative detection of short range electrostatic attraction
90 events. Electrophoresis probably belongs to the most commonly adopted methods for addressing the
91 electrostatic properties of cells surface or NPs. It consists in the application of a direct current electric
92 field between two electrodes positioned in a solution containing the (bio)colloids of interest. Field-
93 induced migration of the latter is tracked by dedicated optical or light-scattering systems depending
94 on (bio)particle size. The so-evaluated (bio)particle electrophoretic mobility is then commonly
95 converted into a zeta potential value and a surface charge density using classical electrokinetic and
96 double layer theories (Planchon *et al.* 2013; Rowenczyk *et al.* 2017; Silva *et al.* 2014). Application of
97 the latter is however strictly valid for hard particles (*i.e.* particles impermeable to ions and fluid flow)
98 at the surface of which a slip plane can be unambiguously identified (Delgado *et al.* 2005), and the
99 concept of zeta potential is physically meaningless for soft (*i.e.* ion- and flow-permeable) particles like
100 bacteria or NPs decorated by polymeric coatings (Beaussart *et al.* 2018a; Dague *et al.* 2006; Duval and
101 Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Li *et al.* 2010; López-Viota *et al.* 2009; Ohshima 1995). The

electrophoretic mobility of soft NPs and bacteria is a measurable quantity that depends not only on the density of charges they carry, but also on the spatial distributions of the charges in the directions parallel and perpendicular to the interface they form with the outer solution (Duval and Gaboriaud 2010; Hill *et al.* 2003; Moussa *et al.* 2015), on their dimension (Duval and Ohshima 2006; Hill *et al.* 2003; Ohshima 1995), on their concentration in solution pending overlap of double layers and/or of hydrodynamic spheres of action between neighboring particles (Maurya *et al.* 2018), on their zwitterionic character if applicable (Beaussart *et al.* 2018b, Moussa *et al.* 2015), on the length and density of their (bio)polymeric fringe (Duval and Gaboriaud 2010; Francius *et al.* 2011), and on the physicochemical composition of the dispersing medium (pH, ionic strength, nature of the electrolyte) (Duval and Gaboriaud 2010; López-León *et al.* 2005; Ohshima 1995; Pagnout *et al.* 2012). Electrophoresis and analysis of so-called electropherograms may further serve to detect -within *e.g.* a given bacteria dispersion- the presence of subpopulations of cells defined by distinct electrostatic surface properties (Dague *et al.* 2006).

To the best of our knowledge, there has been no method reported so far for achieving a rapid *in situ* detection of attractive interactions between NPs and bacteria, and for analyzing heterogeneity in cells response to NPs. Such a method would however add value to preliminary and rapid-screening risk assessment procedures. The elements above indicate that electrophoresis could be used for that purpose. Indeed, NPs generally lead to a modification of cell surface features either as a result of NPs ad-/ab-sorptions (Thill *et al.* 2006; Zeyons *et al.* 2009), NPs-mediated cell abrasion and cell wall integrity loss (Brayner *et al.* 2006; Hayden *et al.* 2012; Huang *et al.* 2008; Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Mecke *et al.* 2005; Shrivastava *et al.* 2007), and subsequent release of intracellular material (Hayden *et al.* 2012; Mathelié-guinlet 2017) that potentially decorates or aggregates NPs in solution. In turn, the electrophoretic cells surface properties and possibly those of the NPs are expected to differ from their pristine values. The purpose of the current study is to explore the potentialities of electrophoresis to discriminate between cells affected or not by NPs action. This requires the analysis of the electrophoretic behavior of NPs-cells mixtures, which is so far missing from nanotoxicology literature that mainly reports zeta potential-based assignment of (bio)particulate monospecies. To reach the aforementioned objective, the electrokinetic fingerprints of mixed suspensions of model NPs (silica NPs decorated by $-NH_2$ groups, 130 nm in diameter (Ribeiro *et al.* 2017, 2014)) and *Escherichia coli* (*E. coli*) cells harboring surface appendages (F-pili (Beloin *et al.* 2010) or YeeJ surface proteins (Martinez-Gil *et al.* 2017)) are analyzed as a function of NPs concentration and solution pH. Results are further complemented by AFM images of bacterial cells in liquid medium in order to visualize cell surface state and NP-mediated cell damage. Overall, the conclusions comfort the potentialities of electrophoresis for assessing the first stage of NPs action toward the surface of biological cells.

137 ## 2. Material and Methods

138 ### *2.1 Bacteria*

139 The *Escherichia coli* K12 mutant strains adopted in this work are listed in **Table 1** where relevant
140 information on their expressed surface appendages, genotype and antibiotic resistance can be found.
141 The genetically modified strains were kindly provided by the Institut Pasteur of Paris (Department of
142 Microbiology, Unité de Génétique des Biofilms). The here-used isogenic strains were generated from
143 *E. coli* MG1655 by construction of linear DNA fragments using Polymerase Chain Reaction (PCR) and
144 the constructions were inserted in *E. coli* genome by λ red recombination (Chaveroche *et al.* 2000).
145 Two cell surface phenotypes were considered: cell membranes exclusively decorated by either F-pili
146 (E2302) appendages (Beloin *et al.* 2010) or by YeeJ large surface proteins (E2551) (Martinez-Gil *et al.*
147 2017). Nude bacteria (E2152), devoid of any of these two surface appendages, served as a control
148 strain. The cells strains E2302, E2551 and E2152 adopted here did not further harbor Ag43 adhesins
149 nor type 1 fimbriae at their surface, as further specified in **Table 1**. F-pili are long flexible proteinaceous
150 filaments with diameter below 10 nm (Costa *et al.* 2016; Wang *et al.* 2009) and their length may range
151 from 10 µm to 100 µm under fully stretched configuration. The number of F-pili typically found on
152 bacterial cells is between 1 and 3 (Dubey and Maheshwari 1999; Reisner *et al.* 2003; Wang *et al.* 2009).
153 These cell surface components play a key role in biofilm formation as they promote initial cell adhesion
154 to abiotic surfaces (Beloin *et al.* 2010; Flemming *et al.* 2016). In addition, the F-pili is well known as
155 mediator of conjugative transfer of plasmids (Silverman 1997). As far as YeeJ proteins are concerned,
156 they also promote biofilm adhesion on abiotic surfaces, their theoretical isoelectric point is 4.79 and
157 their theoretical molecular weight is 244 kDa (Martinez-Gil *et al.* 2017).

158 Using the relevant antibiotics listed in **Table 1**, bacteria were pre-grown in Lysogeny Broth (LB) medium
159 (BD Difco®) for 10 h at 37°C under 160 rpm agitation and aerobic conditions. The pre-culture was then
160 diluted to a 1:50 ratio in minimum M63B1 medium containing 0.4% w/w glucose and appropriate
161 antibiotics (hereafter called M63B1glu medium). In details, this M63B1glu medium contained 13.6 g L^{-}
162 ^{1} KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich®), 2 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ (Emsure®), 0.1 g L^{-1} $MgSO_4,7H_2O$ (Emsure®), 5.10^{-4} g L^{-1}
163 $FeSO_4,7H_2O$ (Sigma-Aldrich®), 1.10^{-3} g L^{-1} thiamine (Roth®) and 4 g L^{-1} glucose (Sigma®). The pre-culture
164 was further grown for 12 h at 37°C, 160 rpm agitation under aerobic conditions. Then, cells culture was
165 re-suspended in fresh M61B1glu, without antibiotics, at an OD_{600} of 0.05, and finally cultured at 37°C,
166 160 rpm until an OD_{600} value of 0.5 was reached.

167 *Preparation of cells suspensions for electrophoresis measurements on bacteria in the absence of NPs*
168 *(results given in **Figure 3**).* Bacteria cultured as detailed above were first centrifuged for 5 min at
169 5000×g and then re-suspended in 10 mM KNO_3 (Sigma-Aldrich®, purity > 99%) so as to reach an OD_{600}

170 of 0.2. Then, batches of cells suspended in 1 mM to 250 mM KNO_3 final electrolyte concentration were
171 prepared in such a way that a final OD_{600} of 0.02 was reached. For that purpose, appropriate volumes
172 of 2M KNO_3 electrolyte, of ultrapure water (milli-Q® water) and of the aforementioned cells
173 suspensions (OD_{600}=0.2, 10 mM KNO_3) were added to get a total final suspension volume of 80 ml. The
174 pH of the resulting cell suspension was then adjusted to the desired value upon addition of HNO_3 and
175 KOH (10^{-2}-10^{-1} M, Fluka®) under agitation conditions (500-700 rpm) and the added acid/base volume
176 did not correspond to more than 1% of the total suspension volume.

177 *Preparation of mixed NPs-cells suspensions for electrophoretic mobility measurements on bacteria in*
178 *the presence of NPs* (***Figure 4***). For the electrokinetic experiments conducted on suspensions
179 containing both bacterial cells and NPs (binary systems), bacteria were first centrifuged for 5 min at
180 5000×g and then re-suspended in 1 mM KNO_3 (Sigma-Aldrich®, purity > 99%) so as to reach an OD_{600}
181 of 0.4. Appropriate volumes of (i) separately prepared 1 mM KNO_3 NPs suspension at 10^{-1} g L^{-1} (pH 3
182 or 7) obtained after 20 min sonication, of (ii) bacteria suspension (OD_{600}=0.4, 1 mM KNO_3) and of (iii) 1
183 mM KNO_3 solution (pH 3 or 7) were then mixed under agitation conditions (500-700 rpm) so as to
184 achieve a final solution composition (28 ml total volume) with NPs concentration in the range 0 g L^{-1}-
185 10^{-2} g L^{-1}, and an OD_{600} of 0.02. The suspension pH was controlled and readjusted if necessary to pH 3
186 or 7. Again, the added acid/base volume did not correspond to more than 1% of the total suspension
187 volume. Mobility measurements in such NPs-cells mixtures were conducted 15 minutes after
188 introduction of the NPs. This time delay thus defines here the duration of the cells exposition to $SiNH_2$
189 NPs. Experiments were carried out twice on freshly prepared samples. Under the conditions applicable
190 in **Figure 4**, the OD_{600nm} is 0.02 and the maximum NPs concentration tested is 10^{-2} g/L, which makes a
191 ratio 'mass of NPs per cell' of about 0.5 pg/cell. This order of magnitude is well in agreement with that
192 considered in other studies (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018).

193 *2.2 Silica nanoparticles (SiNPs in short)*

194 SiNPs were kindly provided by Instituto Superior Técnico, University of Lisboa, Portugal. They were
195 synthetized according to modified Stöber protocol as described elsewhere (Crucho *et al.* 2017; Ribeiro
196 *et al.* 2017, 2014; Stöber *et al.* 1968). Briefly, silica NPs were generated upon hydrolysis and
197 condensation of tetraethoxysilane (TEOS) in ethanol in the presence of ammonia as catalyst. The
198 modification of the SiNPs surface was performed in dry toluene under argon atmosphere (Crucho *et*
199 *al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2014), which results in SiNPs decorated by 2 NH_2 surface groups per nm^2, as
200 determined by nuclear magnetic resonance (Crucho *et al.* 2017). The diameter of the synthesized
201 particles is 130 nm ± 10 nm, as inferred from Transmission Electronic Microscopy (TEM) measurements
202 (Supplementary Material, **Figure S1**). Dried $SiNH_2$ NPs were dispersed in 0.1 mM or 1 mM KNO_3

203 electrolyte to obtain a final 0.1 g L^{-1} NPs concentration. For that purpose, the appropriate weight of
204 NPs was added to half of the desired volume of KNO_3 solution under 1000 rpm agitation conditions for
205 1 min, and the volume was filled with 0.1 mM or 1 mM KNO_3 to reach the final targeted volume. The
206 so-obtained NPs suspension (pH 7) was finally stirred for 24 h at 1000 rpm. Prior to use of NPs
207 suspensions, the latter were systematically sonicated for 20 min and then left at rest for 1 h.

208 *2.3 Size and electrophoretic mobility measurements*

209 Electrophoretic mobilities (μ) of NPs and bacteria considered separately were measured using
210 Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments®, UK) and Zetaphoremeter IV (CAD Instrumentations®, Les
211 Essarts le Roi, France), respectively. The former apparatus is well suited for particles with diameter in
212 the range 1 nm to 6 µm (size measurements) and 5 nm to 10 µm (electrophoretic mobility
213 measurements), and the latter for larger systems with size in the range 0.1 µm to 50 µm (mobility
214 measurements). For mobility measurements performed in the NPs-cells binary systems, the
215 Zetaphoremeter equipment was adopted because our primary interest is the detection of changes in
216 the electrophoretic signature of cells following their interaction with NPs.

217 *2.3.1 NPs electrophoretic mobility and size measurements*

218 **Size measurements**

219 The hydrodynamic diameter of $SiNH_2$ NPs was measured at solution pH 3 and 7 as a function of KNO_3
220 salt concentration (0.1-250 mM) using Dynamic Light Scattering (DLS) (Zetasizer NanoZS, Malvern®)
221 with a 633 nm laser. The particle diffusion coefficient was obtained from the correlation of the
222 measured scattered intensity and converted to hydrodynamic diameter using Stokes-Einstein
223 equation. Results are reported here in the form of particle number-size distributions. The NPs
224 suspensions used for size measurements were prepared from the NPs suspensions obtained in §2.2
225 after proper dilution or addition of KNO_3 salt and pH adjustment using HNO_3 (10^{-1}-10^{-2}M Fluka®) or
226 KOH (10^{-1}-10^{-2}M, Fluka®).

227 **Electrophoretic mobility measurements**

228 The electrophoretic mobility of $SiNH_2$ NPs was measured as a function of pH (3 to 9) and KNO_3 salt
229 concentration in the range 0.1 mM to 250 mM at 25°C using Zetasizer NanoZS. A constant direct
230 current electric field (25 V cm^{-1}) applied between two electrodes immersed in the NPs-containing
231 solution imposes a displacement of the particles. Electrophoretic mobility was then determined using
232 Phase Analysis Light Scattering (PALS) technology (Malvern Instruments). NPs suspensions were
233 prepared in a way similar to that adopted for size measurements. Experiments were carried out 3 to 5
234 times on freshly prepared samples.

235 *2.3.2 Cells electrophoretic mobility measurements and electrokinetics of mixed NPs-*
236 *bacteria suspensions*

237 The Zetaphoremeter was used for electrophoretic mobility measurements of bacteria and of binary
238 NPs-bacteria systems. The instrument consists of a quartz suprasil cell, a laser and a charge-coupled
239 device camera connected to a computer. The camera tracks the positions of the bacteria *via* a laser,
240 and a software processes the obtained images in real time. From the displacement of the tracked cells,
241 subjected to a constant direct-current electric field (800 V m^{-1}), the electrophoretic velocity and
242 electrophoretic mobility were evaluated (Francius *et al.* 2011; Pagnout *et al.* 2012). The electrophoretic
243 mobility of bacteria was measured at pH 3 and 7 as a function of KNO_3 electrolyte concentration (1-
244 250 mM). Cells suspensions and mixed NPs-cell suspensions were prepared along the lines detailed in
245 §2.1.

246 *2.4 Atomic Force Microscopy (AFM) measurements*

247 AFM imaging of bacterial cells was performed under liquid conditions using a Bruker FastScan
248 Dimension Icon with Nanoscope V controller operated in Peak Force tapping mode at 1.0 Hz scan rate
249 (Bruker® corporation, Palaiseau, France). This mode consists in monitoring the intermittent contact
250 between tip and sample surface with application of a 7 nN force, at most (except 12 nN for imaging of
251 E2302 cells at pH 3), which limits possible samples damage by the tip (NPG tips, nominal spring
252 constant of 0.12 N m^{-1}, Bruker, AXS®, Palaiseau, France). Prior to experiments, glass slides were coated
253 with a polycationic polymer (polyethylenimine, PEI in short) to promote electrostatic immobilization
254 of bacterial cells. In detail, the glass slides were cleaned with 1 g L^{-1} RBS 25 solution (Sigma-Aldrich®)
255 at 60°C for 30 min, then rinsed with milli-Q® water, subsequently immersed in a 1 g L^{-1} PEI solution
256 (Sigma-Aldrich®, 7.5 10^6 Mw, 50 wt. % in H_2O) for 30 min and finally rinsed with milli-Q® water. 1.4 mL
257 of bacterial suspension (of pH 3 or 7, and OD_{600} = 0.4) was deposited onto the PEI-coated slides. After
258 30 min, the sample was extensively rinsed with 1 mM KNO_3 solution (pH 3 or 7) and the slide was then
259 fixed to a magnetic puck and placed into the AFM fluid-cell containing 2 mL of 1 mM KNO_3 solution at
260 the sample pH (3 or 7). For AFM imaging of binary systems, bacteria suspensions (OD_{600} = 0.4) were
261 first mixed with 1 mM KNO_3 NPs solution of final concentration 10^{-3} g L^{-1} under 15 min agitation
262 conditions, similar to those adopted for preparing the mixed cells-NPs suspensions analysed by
263 electrokinetics (§2.1). The suspensions were then deposited onto the PEI-coated slides for 30 min and
264 rinsed with 1 mM KNO_3 solution, pH 3 or 7. For each tested condition (pH 3 or 7, presence/absence of
265 $SiNH_2$ NPs), AFM images (256×256 pixels, 3.5 μm×3.5 μm, pixel size=13.7 nm) were recorded on *ca.* 3
266 to 7 cells per strain originating from different cell cultures. Cell surface roughness features (mean value

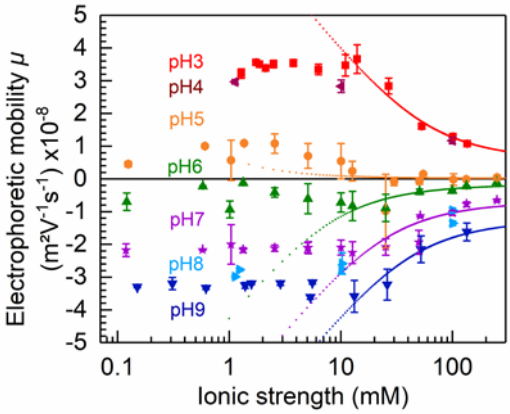
267 and standard deviation) were evaluated from analysis of areas (400 nm×400 nm) of 3 to 7 distinct cells
268 imaged as detailed above.

269 ## 3. Results and Discussions

270 Before analyzing the modulations of the electrokinetic properties of bacterial cells as a result of
271 their interactions with $SiNH_2$ NPs, we discuss below the electrophoretic mobility properties of $SiNH_2$
272 NPs and of the adopted *E. coli* strains, taken separately.

273 ### *3.1 Electrokinetics of $SiNH_2$ NPs and of bacteria*

274 The dependence of the electrophoretic mobility μ of $SiNH_2$ NPs on KNO_3 electrolyte concentration and
275 pH is reported in **Figure 1**.



276

277 **Figure 1: Electrophoretic mobility of $SiNH_2$ NPs as a function of pH (indicated) and solution ionic**
278 **strength (changed upon modification of KNO_3 electrolyte concentration in solution). Colored**
279 **symbols: experimental data. Lines: data reconstruction by means of Ohshima's theory (eqs 1-4).**
280 **Measurements, performed with Zetasizer NanoZS equipment (Malvern Instruments®, UK), were**
281 **carried out on 2 to 5 freshly prepared $SiNH_2$ NPs suspensions, and each of these measurements was**
282 **done in triplicate. Accordingly, each point in Figure 1 is the average of 6 to 15 measurements.**

283 The mobility μ of $SiNH_2$ NPs is negative over the whole range of tested KNO_3 concentrations at pH>6
284 and it is positive for pH values lower than 5-6. The underlying reversal of $SiNH_2$ NPs surface charge is
285 surprising in view of the expected presence of amine surface groups that would lead -if solely
286 considered- to positive NPs mobility regardless of pH and salinity conditions. The reason for this charge
287 reversal stems from the NPs surface functionalization efficiency (2 NH_2 surface groups per nm^2), leaving
288 a considerable amount of hydroxyl groups from the silica structure exposed to the outer aqueous
289 solution (Crucho *et al.* 2017). As a result, the positive charge of the NPs stems from the protonation of
290 $-NH_2$ groups that becomes significant with decreasing pH below *ca.* 6 (**Figure 1**), which is in agreement

with typical p*K* values reported for amine groups (Diallo *et al.* 2004; Tajarobi *et al.* 2001). For pH values larger than 6, the negative charge of NPs originates from the dissociation of the surface hydroxyl groups whose contribution overwhelms that of the poorly protonated -NH_2 groups under such pH conditions. The comparison between $|\mu|$ reached at pH 9 and pH 3 in *e.g.* 10 mM KNO_3 suggests that the NPs surface concentration of -NH_2 and -OH groups is similar. With decreasing salt concentration from 100 mM to 10 mM at fixed pH, $|\mu|$ increases due to reduction of NPs surface charge screening by ions from the background electrolyte. Further decrease in electrolyte concentration results in a mobility that becomes -within experimental error- basically independent of salt content in solution. Two reasons may be invoked for qualitatively explaining the behavior of μ at such low KNO_3 concentrations (here, below 10 mM): (i) double layer polarization effects, that tend to reduce the dependence of μ on salt concentration, as demonstrated elsewhere for highly charged polymer NPs (Duval *et al.* 2013), and/or (ii) changes in the spatial organization of the cationic and anionic surface charges within the thin polyelectrolytic like-layer surrounding the NPs. These latter changes also lead to moderate variations of μ on electrolyte concentration for the reasons detailed by (Moussa *et al.* 2015) in their electrophoresis analysis of zwitterionic carboxylate-terminated poly(amidoamine) dendrimers. In the following developments, we restrict our quantitative analysis of the electrophoretic properties of $SiNH_2$ NPs to KNO_3 concentrations larger than 10 mM with adopting the analytical model developed by Ohshima for soft particle electrokinetics (Ohshima 1995). Soft particles correspond to porous or core/shell particles whose peripheral polyelectrolyte structure is permeable to ions and fluid flow and for which the concept of zeta potential is meaningless (Duval and Gaboriaud 2010). Unlike standard zeta potential-based models strictly applicable to hard particles that are impermeable to ions and flow, soft particle representation was shown to correctly apply to silica NPs (Škvarla 2007) or to latex particles with polymeric surface layer as thin as 1 nm (Duval *et al.* 2013). According to Ohshima (Ohshima 1995), the mobility μ of a soft particle reads as

$$\mu = \frac{\rho_0}{\eta\lambda_0^2} + \frac{\varepsilon}{\eta}\frac{\psi^{\mathrm{o}}/\kappa_{\mathrm{m}} + \psi^{\mathrm{D}}/\lambda_{\mathrm{o}}}{1/\kappa_{\mathrm{m}} + 1/\lambda_{\mathrm{o}}} \quad \textbf{(1)}$$

, where ρ_0 corresponds to the effective charge density of the soft surface layer and $1/\lambda_0$ to the so-called hydrodynamic penetration length, *i.e.* the extent by which the electroosmotic flow developed under electrokinetic conditions penetrates the soft surface layer. η and ε are the dynamic viscosity and dielectric permittivity of the medium, respectively, κ_m the reciprocal Debye layer thickness in the soft surface layer, ψ^0 the surface potential located at the edge of the soft layer, and ψ^D the Donnan potential. Equation 1 holds under conditions where the particle hard core radius *a* and the soft surface layer thickness *d* well exceed the thickness of the double layer at the fluid side of the particle/solution interface, and the hydrodynamic penetration length $1/\lambda_0$ is significantly lower than *d*, *i.e.*

$\kappa a >> 1,\ \kappa d >> 1,\ \lambda_o d >> 1$. These conditions are satisfied at sufficiently large electrolyte concentrations where polarization of electric double layers is insignificant and interfacial potentials are in line with applicability of the Debye Hückel approximation (Duval and Gaboriaud 2010; Duval and Ohshima 2006; Ohshima 1995). The quantities ψ^D, ψ^0 and κ_m all depend on charge density ρ_0 and electrolyte concentration c^∞ (1:1 symmetrical electrolyte is considered here) according to (Ohshima 1995)

$$\psi^{\mathrm{D}} = \frac{RT}{F}\sinh^{-1}\left(\frac{\rho_0}{2Fc^\infty}\right) \quad \textbf{(2)}$$

$$\psi^0 = \psi^{\mathrm{D}} - \frac{RT}{F}\tanh\left(\frac{F\psi^{\mathrm{D}}}{2RT}\right) \quad \textbf{(3)}$$

$$\kappa_{\mathrm{m}} = \kappa\left\{\cosh\left(\frac{F\psi^{\mathrm{D}}}{RT}\right)\right\}^{1/2} \quad \textbf{(4)}$$

, where R is the gas constant, T the absolute temperature, F the Faraday number and κ the salinity-dependent reciprocal Debye layer thickness. **Equations 1-4** successfully fitted the experimental data above 10 mM KNO_3 concentration in **Figure 1** upon adjustment of ρ_0 and $1/\lambda_0$ *via* Levenberg-Marquardt procedure. Results are given in **Table 2** for the various tested pH conditions with ρ_0 expressed in molar concentration of equivalent monovalent charges. In agreement with conclusions from previous work (Škvarla 2007), $SiNH_2$ NPs may be represented by Ohshima's soft (core/shell) particle representation as $1/\lambda_o$ significantly deviates from 0 value (the latter strictly pertains to the limit of hard impermeable particles), in line with the presence of a thin, fuzzy polyelectrolyte layer hosting the -OH and $-NH_2$ surface groups. In detail, the hydrodynamic softness of $SiNH_2$ NPs stems from the non-ideality of their surface *at the molecular scale*, materialized by the presence of asperities, depressions and non-homogeneous distributions of functional groups along- and perpendicular to- their surface. In turn, it is impossible to locate a slip plane for such particulate systems and to define rigorously a common planar location for all ionogenic groups (and therewith defined a *surface charge* density), as traditionally done for the ideal case of hard particles. A way to apprehend these deviations is to reason in terms of volume charge density and to consider that the electroosmotic flow profile *gradually* (and not abruptly as for hard particles) drops to zero from the bulk solution to the particle phase with a decay length scale given by $1/\lambda_o$. These elements explain why particles like $SiNH_2$ NPs behave as soft particles. Ohshima's model overestimates the magnitude of μ for all pH conditions at KNO_3 concentrations below 10 mM where possible double layer polarization, structural modulation of the polyelectrolyte surface layer and deviation from linearized Poisson-Boltzmann and Donnan electrostatics come into play, all these features being discarded in **eqs 1-4** (Duval and Gaboriaud 2010; Moussa *et al.* 2015). Conformably to the above qualitative analysis of **Figure 1**, the isoelectric point of

355 $SiNH_2$ NPs is located at pH~5. The nanometric length scale $1/\lambda_0$ (= 1 $\pm$ 0.3 nm) compares well with
356 results obtained for latex particles of similar size (Duval *et al.* 2013). The absence of marked maximum
357 for $|\mu|$ *versus* salt concentration in **Figure 1,** which contrasts with that evidenced for latex NPs (Duval
358 *et al.* 2013), indicates that double layer polarization effects for $SiNH_2$ NPs are probably less significant
359 than for latex NPs, which qualitatively agrees with the ρ_0 values of the former particle type at pH 7 that
360 are *ca.* 10 times lower in magnitude than those derived for the latex NPs (Duval *et al.* 2013). Finally,
361 the increase in $1/\lambda_0$ with pH suggests that the thickness and/or structure of the thin polyelectrolyte-
362 like layer slightly changes with pH as a result of modification of the electrostatic interactions between
363 neighboring $-O^-$ or $-NH_3^+$ ionogenic surface groups, a feature evidenced for nanoparticulate dendrimers
364 (Moussa *et al.* 2015). Following these conclusions, and exploiting the unexpected reversal in $SiNH_2$ NPs
365 mobility at pH 5, the pH 7 and pH 3 conditions were selected for deciphering below the impacts of
366 $SiNH_2$ NPs on cell electrokinetic properties (§3.2).

367 In order to ascertain that suspensions of $SiNH_2$ NPs remain stable against aggregation under
368 conditions adopted for the experiments carried out in the presence of bacterial cells (*i.e.* pH 3 or 7,
369 and 1 mM solution ionic strength), particle size measurements were performed by DLS at pH 3 and 7
370 as a function of salt concentration (**Figure 2**), as detailed in §2.3.1. In good agreement with
371 independent TEM measurements (**Figure S1**), $SiNH_2$ NPs hydrodynamic diameter is 140 $\pm$ 10 nm at ionic
372 strengths lower than 10 mM, regardless of pH. The NPs suspensions stability at pH 7 confirms the
373 existence of (negative) electrostatic charges at the surface of $SiNH_2$ NPs (as independently evidenced
374 by electrokinetics), which ensures the operability of repulsive interactions between particles and the
375 establishment of a significant energy barrier they must overcome to form aggregates at such a pH. At
376 larger solution ionic strengths (25 mM-150 mM) and pH 7, a bimodal distribution in particle size is
377 obtained, which pinpoints the presence of particle aggregates with broad size distribution. The
378 respective magnitude of the detected intensity peaks still denotes a predominant proportion of
379 individual particles over that of aggregates (500 nm-700 nm in diameter). At 250 mM solution ionic
380 strength, particles suspensions become unstable as particle size may then exceed micrometer scale
381 and the contributions of aggregates to the overall size distributions becomes significant. Similar
382 features are observed at pH 3. Given these elements, the stability of the $SiNH_2$ NPs suspensions against
383 aggregation is ensured in 1 mM solution ionic strength both at pH 3 and 7 (the conditions adopted for
384 electrokinetic analysis of binary NPs-cells system).

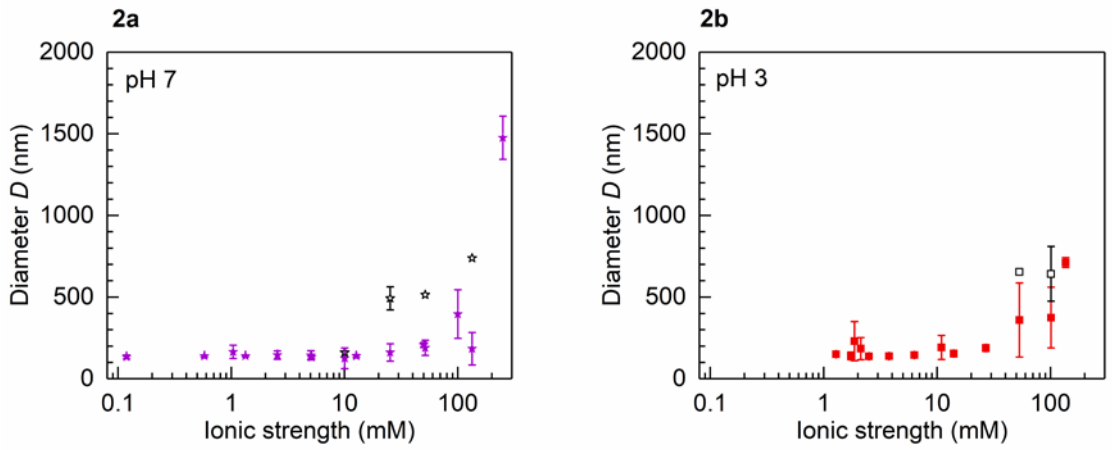


Figure 2: $SiNH_2$ NPs hydrodynamic diameter D at pH 7 (2a) and pH 3 (2b) as a function of solution ionic strength. Filled symbols correspond to the first mode detected in the number-size distributions obtained by DLS. Empty bullet points correspond to the second mode if applicable. Due to the contribution of protons to the overall solution ionic strength, there are no data points in panel b at 1 mM ionic strength after addition of KNO_3 electrolyte.

As our intention is to assess the electrokinetic cell features (in mixed cell-$SiNH_2$ NPs suspensions) as a function of NPs concentrations in solution, we further identified the range of $SiNH_2$ NPs concentration in line with constant $SiNH_2$ NPs electrophoretic mobility. Respecting the NPs concentrations window recommended by Malvern (NanoZS) and CAD (Zetaphoremeter IV apparatus) manufacturers, we found that the mobility of $SiNH_2$ NPs at pH 3 (pH 7, respectively) in 1 mM solution ionic strength is μ=2.1±0.6×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ at 10^{-3} g L^{-1} (μ=-1.8±0.1×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$, respectively) and μ=2.5±0.5×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ at 10^{-2} g L^{-1} (μ=-2.0±0.4×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$, respectively), as obtained with Zetaphoremeter IV equipment (CAD Instrumentations®). Measurements with Zetasizer NanoZS (Malvern) lead at pH 3 (pH 7, respectively) to μ=2.4±0.6×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ at 10^{-2} g L^{-1} (μ=-1.9±0.7×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$, respectively) and μ=3.0±0.7×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ at 10^{-1} g L^{-1} (μ=-1.7±0.9×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$, respectively). At fixed pH (3 or 7), within experimental error μ values therefore remain constant in the 10^{-3} g L^{-1} (or lower) to 10^{-2} g L^{-1} NPs concentration range: this NP concentration range is therefore adopted in §3.2 dedicated to the electrokinetic analysis of mixed NPs-bacteria suspensions using Zetaphoremeter IV equipment.

The electrophoretic mobility of the 3 different bacterial strains (nude, YeeJ or F-pili decorated cells, see §2.1) was measured as a function of solution ionic strength (1 mM to 250 mM at pH 3 and 7). Results are reported in **Figure 3**. As expected for bacterial cells, μ is negative for all strains at both pH conditions and the observed classical decrease of $|\mu|$ with increasing salt concentration refers to screening of the charges carried by cells envelopes (Duval and Gaboriaud 2010). Distinct electrokinetic cells responses are further observed depending on their respective surface phenotype. In detail, at

411 pH 7 (**Figure 3a**) $|\mu|$ of the nude cells (E2152) is systematically higher than that measured for the F-
412 pili- and YeeJ-decorated bacteria (E2302 and E2551, respectively). In addition, $|\mu|$ of E2302 (F-pili) and
413 of E2551 (YeeJ) cells exhibit -within experimental error- identical electrokinetic behavior over the
414 range of ionic strengths tested. The results displayed for E2152 (nude cells) and E2302 (F-pili bacteria)
415 compare well with those previously reported by Francius *et al.* (2011), to which the reader is referred
416 for details. The differences in mobility between the three strains primarily originate from modifications
417 of the electrostatic cell surface features and cell drag forces as a result of the selective expressions of
418 YeeJ and of F-pili protruding surface appendages. These modifications are addressed here from
419 analysis of the data in **Figure 3** on the basis of **eqs 1-4** along the lines detailed above for investigation
420 of NPs electrokinetics (**Figure 1**), recalling that bacteria are paradigms of soft (bio)colloids (Duval and
421 Gaboriaud 2010). The results provided in **Table 3** highlight that the density of charges distributed
422 within the electrokinetically active peripheral zone of the nude bacteria at pH 7 is *ca.* two times higher
423 than that pertaining to E2302 and E2551 cells. While the latter two bacterial strains are defined by
424 similar ρ_o (~97±4 mM) and similar Brinkman lengths ($1/\lambda_o$~0.85 nm), their permeability to
425 electroosmotic flow appears to be somewhat larger than that for nude cells ($1/\lambda_o$~0.5 nm). Surface
426 appendages thus contribute here to slightly increase flow permeability (*i.e.* increase of $1/\lambda_o$) and to
427 hydrodynamically screen the charges carried by the underlying supporting membrane, thereby
428 reducing the density of the charges that are effectively probed by the tangential electroosmotic flow
429 developed under electrophoretic conditions. Remarkably, within experimental error the electrokinetic
430 properties of the three strains of interest are similar at pH 3 over the whole range of solution ionic
431 strengths tested (**Figure 3b**), and the corresponding $|\mu|$ is systematically smaller than that measured
432 at pH 7 due to expected protonation of the proteins and other moieties located at the bacterial cell
433 surfaces. Overall, the respective magnitudes of $1/\lambda_o$ (= 0.7±0.2 nm, with no marked dependence on
434 pH) and ρ_o values derived for the cells of interest at pH 7 and 3 correctly fit into the data compilation
435 done by Duval and Gaboriaud from electrokinetic literature on Gram-negative bacteria (Duval and
436 Gaboriaud 2010).

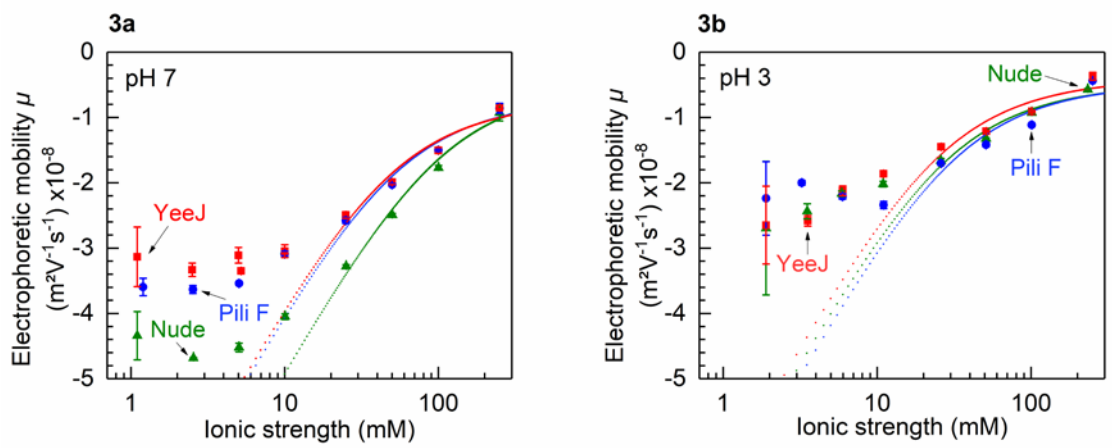


Figure 3: Electrophoretic mobility of the adopted bacterial strains (nude (E2152), F-pili (E2302) and YeeJ (E2551) cells, indicated) at pH 7 (3a) and pH 3 (3b) as a function of solution ionic strength. Symbols: experimental data. Dotted lines: theory (eqs 1-4). Due to the contribution of protons to the overall solution ionic strength, there are no data points in panel b at 1 mM ionic strength after addition of KNO_3 electrolyte.

3.2 Electrokinetics of mixed bacteria-NPs suspensions

The electrophoretic properties of the mixed bacteria-NPs suspensions (see methodology detailed in §2) are given in **Figure 4** in the forms of electrophoretic mobility distributions reported as a function of concentration of $SiNH_2$ NPs in solution at pH 7 and pH 3 for the different cell surface phenotypes considered in this work. For the sake of comparison, the mobility distributions featuring the electrokinetic properties of cells and NPs taken separately are further displayed in **Figure 4**. Accordingly, the first and last lines in each of the diagrams of **Figure 4** refers to the electrokinetic responses of $SiNH_2$ NPs and bacteria, respectively. The electrophoretic fingerprints of the cells and those of the $SiNH_2$ NPs in mixed NP-cells suspensions correspond to the mobility-plumes located at the left and right side of the diagrams in **Figure 4**, respectively. In **Figure 4**, the frequency reported for a given class of electrophoretic mobility values μ (the width of each class is set here to 0.15×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ increment in μ) corresponds to the ratio between the number of particle trajectories detected at these selected μ and the total number of trajectories measured over the whole range of measured mobility values. As such, this frequency is systematically lower than unity. Traditionally, electropherograms display distributions of electrophoretic mobility in the form of frequency (of detected trajectories) *versus* μ (see *e.g.* Dague *et al.* 2006). The representation in **Figure 4** is nothing else than this, except that distributions are here reported as a function of NPs concentration in solution (*y*-axis) and that frequencies are scaled according to the color code detailed in **Figure 4**. The result is

462 the establishment of 2D electrophoretic plumes of the cells and of the NPs whose deformation along
463 the y-axis informs about NPs actions on microorganisms surface, as extensively discussed below.
464 At pH 7, in line with data in **Figure 3**, cells electrophoretic mobility ranges from -5 to -4×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$
465 (E2152, nude cells), from -4 to -3×10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$ (E2551, YeeJ) and from -4 to -2.5 x 10^{-8} $m^2V^{-1}s^{-1}$
466 (E2302, F-pili decorated). The width and frequencies defining the mobility distributions of E2152 and
467 E2551 cells remain basically unchanged upon increase of $SiNH_2$ NPs concentration up to 10^{-3} g L^{-1} (see
468 the yellow core of the cells-associated plumes). With further increasing NPs concentration in solution,
469 electrophoretic detection of the NPs becomes possible and their frequency of electrokinetic apparition
470 increases noticeably, as judged from the color gradient in the down-to-top direction along the NPs-
471 associated plumes in **Figures 4a** and **4b**. Concomitantly, there are lesser bacterial cells detected and
472 their maximum frequency of electrokinetic apparition decreases from 0.2 to 0.05 with increasing NP
473 concentrations from 10^{-3} g L^{-1} to 10^{-2} g L^{-1}. The most important conclusion at this stage is the absence
474 of deformation of the cells-electrokinetic plume with increasing $SiNH_2$ NPs, which suggests that the
475 electrohydrodynamic properties of E2152 and E2551 cells remain basically unaffected in the presence
476 of $SiNH_2$ NPs. This is in line with the repulsive electrostatic interactions expected on the basis of the
477 electrostatic properties of the negatively charged E2152/E2551 cells and $SiNH_2$ NPs as pictured in
478 **Figure 3a** and **Figure 1**, respectively. Similar conclusions may be formulated for E2302 cells even
479 though, qualitatively, the width of their mobility distributions tends to slightly increase with increasing
480 $SiNH_2$ NPs from 0 to 10^{-2} g L^{-1}, resulting in an overlap of the cells- and NPs-plumes that is significantly
481 more pronounced than for E2152 cells. This finding underpins that a fraction of E2302 cells are
482 impacted *via e.g.* interactions of their long protruding pili with NPs, a mechanism that can bypass the
483 repulsive energy barrier that is otherwise required for E2152 cells and NPs to get into contact (van
484 Loosdrecht *et al.* 1990). This feature would obviously require further investigation at the proper F-pili
485 spatial scale *via e.g.* dedicated AFM-based investigations. Within the limits of detection, there are no
486 obvious sign of changes of the native NP electrokinetic signal in the presence of bacteria at pH 7,
487 irrespective of the cells surface phenotype considered.
488

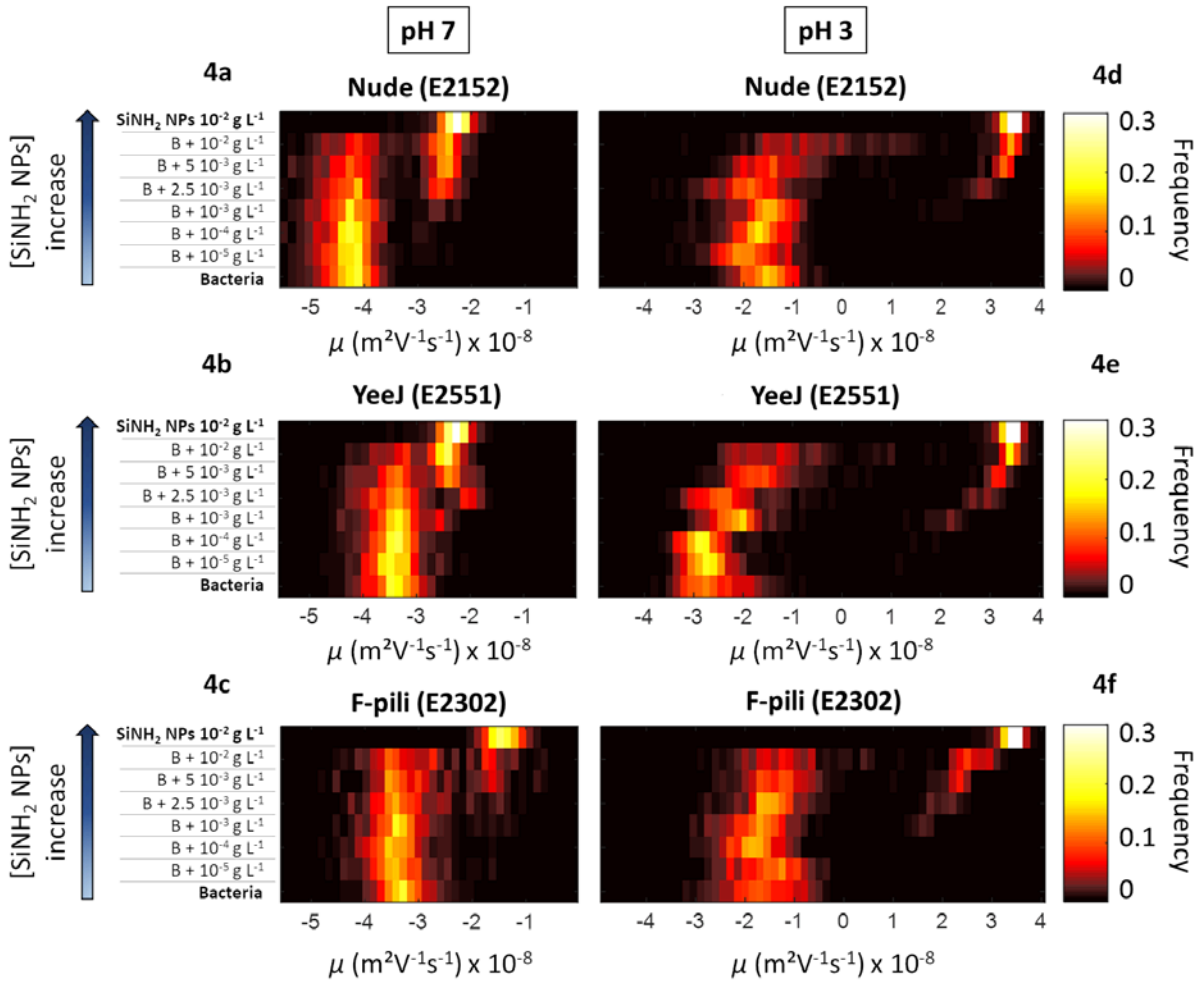


Figure 4: Electrophoretic fingerprints of mixed bacteria-$SiNH_2$ NPs suspensions at pH 7 and pH 3 (indicated) as a function of $SiNH_2$ NPs concentration in solution for the three cell surface phenotypes of interest (indicated). Solution ionic strength: 1 mM at pH 7 and 2 mM at pH 3. See text for details (§2 and §3.2). 'B' stands for bacteria.

At pH 3 (**Figures 4d, e, f**), the situation dramatically differs from that discussed at pH 7. Indeed, the mobility distributions pertaining to the bacterial cells and/or to the $SiNH_2$ NPs, set under mixed conditions, are now significantly impacted with increasing NPs concentration in solution. The associated deformations of the cells- and/or NPs-electrokinetic plumes further differ according to the cell surface phenotype considered. In detail, starting with the case of E2551 bacteria (YeeJ-decorated cells, **Figure 4e**), the signal stemming from bacteria is clearly shifted to lesser negative mobility values in the presence of $SiNH_2$ NPs and the more so as the NPs concentration increases. The corresponding width of mobility distribution further increases and its extremes are shifted to more positive values. This distortion of the cells-electrokinetic plume compounds the shift of the NPs-associated electrokinetic fingerprints to more positive values with increasing NPs concentration in solution. These results indicate that electrostatic attractions operating between positively charged $SiNH_2$ NPs (**Figure**

505 **1**) and negatively charged E2551 cells (**Figure 3b**) at pH 3 induce significant changes of the surface
506 features of **both** bacteria and NPs. More specifically, a fraction of NPs likely adsorbs at the cells surface
507 to an extent that depends on electrostatics (favourable at pH 3) and on their chemical affinity to cell
508 surface biocompounds (YeeJ proteins or other molecules like lipopolysaccharides). Other possible NPs
509 action mode includes cell surface abrasion and subsequent removal of charged bio-residues originally
510 anchored at the cell membrane (Shrivastava *et al.* 2007). As a result, the effective charge density of
511 the so-modified cell envelope probed by electrokinetics becomes less negative, in line with the cells-
512 plume features given in **Figure 4e**. In addition, bacterial cells under stress conditions may excrete
513 biomolecules (*e.g.* proteins, metabolites, exopolysaccharides). The latter in turn can modify the
514 surface properties of the external agents at the origin of the stress (here the $SiNH_2$ NPs) (Kimkes and
515 Heinemann 2018; Majdalani *et al.* 2005), minimize the impacts cells undergo and/or diminish the long-
516 scale interactions that cells experience with these stressors (Zeyons *et al.* 2009). These biomolecules
517 may further be released following NP-mediated cell surface abrasion invoked above and/or cleavage
518 of cellular surface material following holes formation at the membrane. Such biotic retroaction
519 processes would lead to a (negatively charged) bio-corona acquisition by NPs, and thus to a decrease
520 of the net surface charge of the $SiNH_2$ NPs (Sheng *et al.* 2005; Zeyons *et al.* 2009). This expectation
521 agrees with the trend in **Figure 4e** and with the aforementioned changes in $SiNH_2$ NPs electrokinetic
522 plume. Obviously, the higher the $SiNH_2$ NPs content in solution (at fixed cells concentration), the lower
523 the modification of their surface upon interaction with cells and/or with excreted cells biocomponents,
524 the easier is their electrokinetic detection in mixed cell-NPs suspension and, concomitantly, the lesser
525 efficient becomes the electrophoretic tracking of cells. This argument explains the decrease (increase,
526 respectively) of the frequency maximum in mobility distributions pertaining to the cells (NPs,
527 respectively) upon increasing $SiNH_2$ NPs concentration. This conclusion is supported by the colour scale
528 gradient upon moving along the deformed cell- and NPs-electrokinetic plumes.

529 Qualitatively, the modulations discussed above for the E2551/$SiNH_2$ NPs electrokinetic diagram at
530 pH 3 are also observed for the mixed E2152/$SiNH_2$ NPs at this pH (**Figure 4d**). However, the distortions
531 of the $SiNH_2$ NPs- and E2152-plumes take place at larger NPs concentrations, *i.e.* 2.5×10^{-3} g L^{-1} and 10^{-}
532 ^{2} g L^{-1}, respectively, instead of 10^{-3} g L^{-1} and 5×10^{-3} g L^{-1} for the E2551/NPs system. This suggests that
533 the resistance of the nude E2152 bacteria against NPs action is more efficient than that of YeeJ-
534 decorated cells. Possibly, the protusion of YeeJ proteic islands over the cell surface facilitates non-
535 specific electrostatic attractions with incoming NPs, as anticipated from theory by Duval *et al.* on
536 interactions between rough surfaces (Duval *et al.* 2004). YeeJ proteins can also feature shorter-range
537 specific interactions with $SiNH_2$ NPs. In both scenarios, YeeJ proteins promote contacts between cells
538 and $SiNH_2$ NPs and, therewith, NPs-mediated modifications of the overall cell electrosurface

539 characteristics. Finally, it is found that the situation for E2302/$SiNH_2$ NPs (**Figure 4f**) is intermediate
540 between that for E2551/$SiNH_2$ NPs and E2152/$SiNH_2$ NPs systems. Indeed, while the deformation of
541 the E2302 electrokinetic plume better compares with that obtained for the nude E2152 bacteria
542 (**Figure 4d**), the marked modulation of the $SiNH_2$ NPs signal in the presence of E2302 cells is
543 qualitatively more similar to that of $SiNH_2$ NPs in presence of E2551 cells (**Figure 4e**). Further
544 comparison between **Figure 4e** and **Figure 4f** reveals that modifications of the $SiNH_2$ NPs surface
545 properties with increasing $SiNH_2$ NPs concentration in NPs-cells mixtures are more significant in
546 presence of E2302 cells than they are with E2551 cells. This conclusion is inferred from the
547 corresponding shift in NPs electrophoretic mobility distribution to lesser positive values at fixed NPs
548 concentration. Addressing the complex molecular processes that govern the modifications of the cells
549 and NPs surface properties would obviously require reasoning beyond the electrokinetics framework
550 and ask for integration of *e.g.* genomic/transcriptomic or micro-spectroscopy data in the analysis,
551 which is not the scope of the current study. Instead, we demonstrate that simple electrophoretic
552 methods may already help in detecting rapidly cells that are impacted by NPs, and identify some
553 conditions where such effects are at stake. Altogether, **Figure 4** evidences (i) the role of electrostatics
554 in mediating NPs-cells interactions, (ii) the heterogeneous response of the cells to NPs exposition (as
555 reflected by changes in mobility distribution width), and (iii) the differentiated roles played by cells
556 surface bio-compounds in promoting or not NPs action. In the next section, we provide AFM images of
557 individual cells exposed to $SiNH_2$ NPs as an additional support for the trends given in **Figure 4**, recalling
558 that electrokinetic measurements refer to averages of electrohydrodynamic properties over the whole
559 assembly of cells in solution.

560 *3.3 Bacterial cell surface imaging and roughness evaluation*

561 TEM is commonly adopted for imaging biological samples (El Badawy *et al.* 2011; Silva *et al.* 2014).
562 However, the required sample preparation protocol, which involves sample drying, may lead to
563 degradation of the native biosurface structures (Hardij *et al.* 2013). AFM measurements in liquid
564 environment offer an option for avoiding such artefacts (Beaussart *et al.* 2018b; Bolshakova *et al.* 2004;
565 Dufrêne 2008; Jandt 2001). **Figure 5** collects typical AFM Peak Force images obtained for the three
566 bacterial strains of interest, E2152, E2551 and E2302 before and after exposure to $SiNH_2$ NPs at pH 7
567 and pH 3.

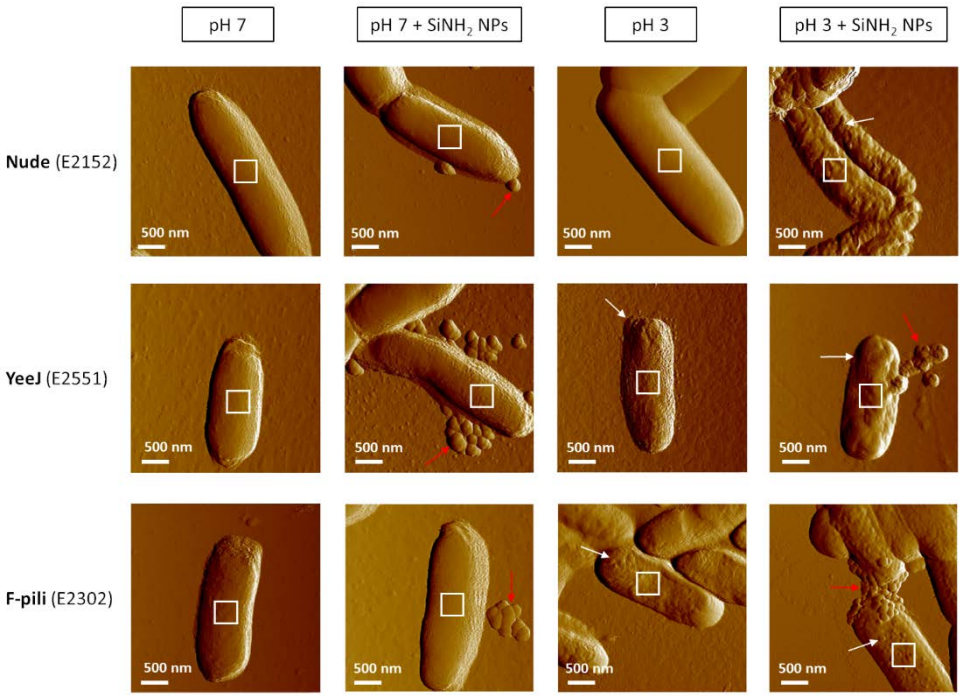


Figure 5: AFM peak force error images (3.5 µm × 3.5 µm, 256 pixels × 256 pixels) taken in liquid for E2152, E2551 and E2302 bacteria (indicated) at pH 7 and 3 (indicated) prior to and after incubation with NPs (see details in §2). Red arrows correspond to NPs, white arrows to asperities or depressions, white squares define 400 nm × 400 nm spatial regions where cell surface roughness features were evaluated.

The AFM cell pictures obtained in the absence of $SiNH_2$ NPs at pH 7 (left column, **Figure 5**) display normal bacterial morphologies with aspects that agree well with those detailed in previous reports (Beloin *et al.* 2010; Francius *et al.* 2011). In particular, identification of YeeJ and pili structures at the surfaces of E2551 and E2302 is not possible from AFM imaging under liquid conditions as argued elsewhere (Francius *et al.* 2011). Cell surface imaging in air allows however visualization of the long surface appendages like pili (**Figure S2** in Supplementary Material). In the presence of $SiNH_2$ NPs (2nd column from the left, **Figure 5**), cell envelopes imaged at pH 7 do not suffer from marked asperities or depressions even though individual $SiNH_2$ NPs or aggregates may be found in the close vicinity of the cells and/or at their surface. The corresponding AFM images contrast with those obtained at pH 3 in the presence of $SiNH_2$ NPs (right column in **Figure 5**). Under such conditions, nude E2152 cell surfaces appear wrinkled, YeeJ-decorated E2551 cells anomalously disrupted with pronounced inflammatory points, and E2302 cells (with F-pili) significantly blistered all over their surface envelope that is in further intimate contact with apparently cohesive $SiNH_2$ NPs clusters. Modifications of E2302 and E2551 surface morphologies and topographies are also -to a lesser extent- caused by the acidic pH environment, as revealed by AFM images on selected cells obtained at pH 3 in the absence of $SiNH_2$

589 NPs (third column from left in **Figure 5**). Images of certain YeeJ-decorated cells collected at pH 3
590 without $SiNH_2$ NPs (not shown here) indicate the presence of spheroids with *ca.* 70 nm diameter in the
591 vicinity of their surface. The origin and nature of these entities remain difficult to establish, *e.g.* they
592 could identify with outer membrane vesicles (OMVs). The latter may originate from the constitutively
593 expressed YeeJ, which slightly perturbs outer membrane structure and favours OMVs production
594 (McBroom and Kuehn 2007) and/or acidic pH condition may induce outer membrane structure
595 modifications and lead to a release of (aggregated) YeeJ proteins. Altogether, the $SiNH_2$ NPs-induced
596 changes in cell surface integrity recall those identified on *E. coli* bacteria (MRE 162 strain) exposed to
597 negatively-charged modified SiO_2 NPs (diameter < 80 nm) or to positively-charged functionalized SiO_2
598 NPs (diameter *ca.* 100 nm) synthetized according to Hartlen protocol (Hartlen *et al.* 2008; Mathelié-
599 Guinlet *et al.* 2018). Qualitatively, the electrokinetic fingerprints of mixed NPs-cells suspensions
600 displayed in **Figure 4** at pH 7 and 3 well conform to the qualitative presence or absence of marked cell
601 surface alterations pictured in **Figure 5.** The highly heterogeneous cell surface properties identified by
602 AFM at the single cell level in the presence of $SiNH_2$ NPs echo the dispersity of the mobility distributions
603 symptomatic of the heterogeneous cells response examined at the population scale.

604 Various procedures are reported in the literature to quantify cells surface roughness, and they
605 differ according to the mode of evaluation of the reference surface, *e.g.* using least-squares,
606 multinomial or arithmetic mean regression (Chen *et al.* 1999). Once determined, this reference surface
607 is subtracted from the initial raw image and the sample surface roughness can then be estimated on
608 the basis of the distribution in local height variations. These methods however suffer from the non-
609 unicity of the reference surface whose characteristics inherently depend on factors like sampling
610 length and sampling location (Chen *et al.* 1999). It is therefore required to resort to frequency-based
611 sampling of cells surface heterogeneities, as done within the framework of wavelet analysis (Chen *et*
612 *al.* 1999) or Gaussian filtering (Geusebroek *et al.* 2003) of images. In this work, a Gaussian filter with
613 standard deviation σ_1 ranging from 0.4 to unity was applied to 400 nm × 400 nm AFM images of
614 bacteria (**Figure 5**). The resulting images were subsequently subtracted from the initial AFM images,
615 thus making possible the estimation of the relevant distribution of heights counted from the
616 corresponding basal cell topography reference. Typical examples are given in **Figure 6**. The height
617 distributions were then successfully fitted according to a normal distribution law (centered at the
618 maximal height value) defined by a standard deviation, hereafter denoted as σ_2, that varies linearly
619 with σ_1. The (dimensionless) slope (denoted as ω) of the obtained σ_2 *versus* σ_1 linear plots reflects the
620 searched cell surface roughness, with a perfectly smooth surface corresponding to $\omega = 0$. **Figures S3**,
621 **S4** and **S5** in Supplementary Material illustrate the different steps of this procedure we followed for

evaluation of cells surface roughness. The ω proxies for cell surface roughness, as derived under the conditions of **Figure 5**, are reported in **Table 4.**

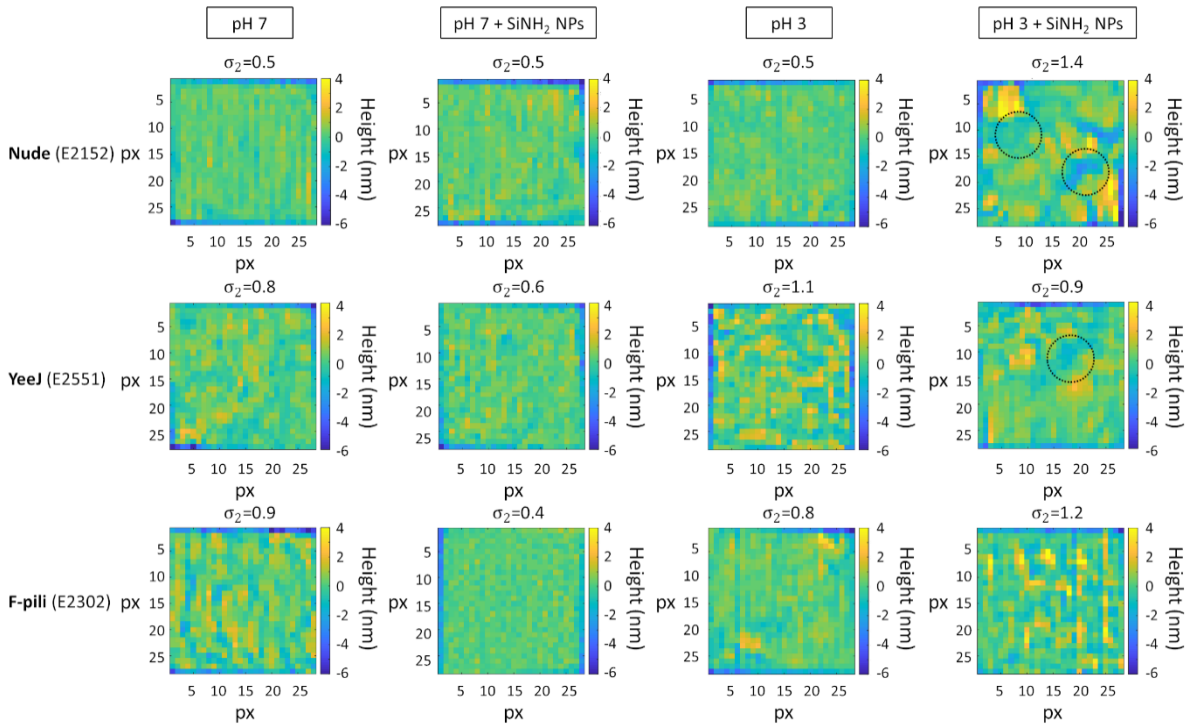


Figure 6: Illustrative spatial mapping (400 nm × 400 nm, 28 pixels × 28 pixels) of sample heights derived after application of a Gaussian filter (here, standard deviation σ_1=1) and subtraction from the corresponding raw images. Locations of surface areas where roughness analysis was conducted are provided in Figure 5 for illustration (white squares therein). Bacterial surfaces were imaged at pH 7 and 3 in the presence of 10^{-3} g L^{-1} $SiNH_2$ NPs (indicated). σ_2 corresponds to the standard deviation in height distribution successfully fitted according to a normal distribution law. The black dotted circles are defined by a radius that is equivalent to that of a single NP, and they are positioned at cell surface areas featuring lateral heterogeneities with dimensions reminiscent of NP fingerprints. 'px' stands for pixel. Lines of blue pixels positioned at the image borders correspond to side effects in Gaussian filtration procedure and these pixels were thus not considered for evaluation of σ_2.

For the nude (E2152) strain imaged at pH 7 in the absence of NPs, σ_2 evaluated at σ_1=1 is 0.5 (**Figure 6**). For the YeeJ (E2551) and F-pili (E2302) strains, σ_2 reaches larger values (0.8 or 0.9 at σ_1=1), which is in agreement with the presence of peripheral surface appendages and with the so-rendered rougher cell walls. The presence of $SiNH_2$ NPs tends to 'smooth' the surface of YeeJ and F-pili bacteria at pH 7 (σ_2~0.4-0.6 at σ_1=1) and the roughness associated with the presence of the parietal structures then becomes less pronounced. Acidic pH environment does not seem to significantly affect the roughness

642 of bacterial surface evaluated at pH 7, except for YeeJ cell type. However, the presence of $SiNH_2$ NPs
643 at pH 3 leads to the formation of craters or depressions (-2 nm to 0 nm in height) for the nude (E2152)
644 and YeeJ (E2551) strains -which possibly corresponds to NP fingerprints (**Figure 6**)- and to surface
645 islands whose size is significantly larger than that observed in the absence of NPs. Although
646 distinguishable artefacts remain after application of the Gaussian filter to images of F-pili (E2302) at
647 pH 3 in the presence of NPs, σ_2 estimated at σ_1=1 under such conditions is significantly larger than that
648 obtained at pH 3 in the absence of NPs. The above observations are based on height mappings
649 collected on a given bacterial cell and discussed at a specific frequency-filtration defined by σ_1=1. To
650 provide a hint of the inherent heterogeneities in cell damages caused by NPs, we discuss below the ω-
651 results obtained from analysis of 3 to 7 distinct cells (**Table 4**). These results reflect the outcomes of
652 the image filtration procedure over a larger range of selected σ_1 values (0.4 to 1).

653 Concerning nude (E2152) bacteria, ω is of the same order of magnitude at pH 7 and at pH 3 in the
654 absence of $SiNH_2$ NPs, which is in line with qualitative observations of **Figure 5**. For the YeeJ (E2551)
655 strain, ω significantly increases from pH 7 (1.23) to pH 3 (1.96), thus highlighting the impact of an acidic
656 environment on cell surface morphology, as invoked from analysis of **Figure 5**. For F-pili (E2302)
657 bacteria, acidic pH condition seems to induce a 'smoothing' of the cells surface (1.15 instead of 1.43 at
658 pH 7) but firm conclusions are difficult to derive due to lack of statistics (see reasons in caption **Table**
659 **4**). Furthermore, the presence of $SiNH_2$ NPs at pH 3 magnifies the roughness of F-pili (E2302) cells
660 surface estimated in the absence of NPs. Unlike E2302 cells at pH 7, ω pertaining to E2152 and E2551
661 cells is not significantly impacted by the presence of $SiNH_2$ NPs. At pH 3, ω for E2152 cells is *ca.* two
662 times higher in the presence of $SiNH_2$ NPs, which conforms to the disrupted cell surface featured in
663 **Figure 5**. The pronounced depressions observed all over E2152 cell surfaces possibly result from
664 contacts with $SiNH_2$ NPs as their diameter (*ca.* 150 nm) qualitatively compares with that of $SiNH_2$ NPs
665 (**Figures 5**, **6**). These lesions are the result of an alteration of the bacterial membrane integrity and
666 potentially to a disruption of the peptidoglycan layer (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018). For the YeeJ
667 (E2551) strain, ω at pH 3 is lower in presence of NPs, consistent with the apparent cell surface
668 flattening observed in **Figures 5 and 6**. This is possibly due to the presence of the spheroids with *ca.*
669 70 nm diameter observed at pH 3 in the absence of NPs by AFM for YeeJ (E2551) strain. These
670 spheroids may correspond to outer membrane vesicles and their presence at the cell surface as well
671 as their very production mechanism (budding of the outer membrane) likely result in the formation of
672 membrane defects, reflected by an increase in surface roughness at pH 3 as compared to pH 7. In turn,
673 such so-rendered fragile membrane could undergo an efficient abrasion by the NPs, leading to
674 smoothing of the cell envelope. Another scenario can be proposed by examining the way YeeJ proteins
675 are anchored at the outer membrane. Indeed, YeeJ proteins are composed of several domains: a LysM

676 domain which is anchored in the peptidoglycan, a β-barrel domain embedded in the outer membrane
677 and a passenger domain on the exposed C-terminal region of the protein (Martinez-Gil *et al.* 2017).
678 The only passenger domain can be cleaved from the bacterial surface. Upon NPs action, YeeJ could
679 undergo an abrasion of the exposed passenger domain, leading to a smoothing of the cell envelope,
680 while the LyM and β-barrel domains would stabilise the cell wall, thereby preventing further damage
681 of the outer membrane (such mechanism could hold both at pH 3 and 7). Obviously, analysis of such
682 scenario would require further investigations with use of dedicated micro-spectroscopies. **Table 4**
683 suggests that YeeJ-cells E2551 are the most affected strain when lowering pH from 7 to 3 in the
684 absence of $SiNH_2$ NPs. In parallel, **Figure 4** evidences that this strain is the one among the three
685 investigated for which the shift in electrophoretic mobility is the most significant at pH 3 with
686 increasing $SiNH_2$ NPs concentration. These observations underpin the pronounced sensitivity of E2551
687 to external stressors (pH and NPs conditions) and the propensity of these cells to be strongly affected
688 when these stressors are combined (cocktail effect).

689 ## 4. Conclusions

690 In this study, we show that electrophoresis of mixed suspensions of bacteria and NPs is a suitable
691 method for screening the impacts of NPs on cell charge density, cell envelope integrity and/or
692 peripheral structure, which translates into detectable modifications of the electrohydrodynamic cell
693 fingerprints. The existence of favorable attractive interactions between NPs and cells -and of the
694 subsequent changes in the physicochemical properties of the cell surfaces following their contacts and
695 collisions with NPs- can be rapidly 'read' from inspection of the cells and NPs mobility distributions,
696 *e.g.* measured as a function of NPs concentration and pH. In particular, the associated deformation of
697 the electrokinetic plumes pertaining to cells and NPs can provide information not only on the critical
698 NPs concentration marking the onset of significant NPs action, but also on possible biological
699 retroaction processes leading to alterations of NPs surface properties. The demonstration is based on
700 measurements performed on genetically engineered *E. coli* cells defined by distinct surface
701 phenotypes and on functionalized silica NPs (65 nm radius) whose respective electrokinetic
702 characterizations are given here in terms of relevant soft surface electrokinetic concepts instead of
703 meaningless zeta potential parameter. The analysis clearly highlights the role of electrostatics and of
704 cell surface bio-compounds in mediating cells-NPs interactions and ensuing NPs-mediated deleterious
705 effects on bio-surface. Electrokinetic data are further qualitatively supported by AFM cell surface
706 imaging, thereby featuring multiscale heterogeneities in cells response to NPs, from the cell (*via* AFM)
707 to the population (*via* electrokinetics) organization levels. Altogether, this study demonstrates the
708 potential of electrokinetics to probe the precursory NPs-cells interactions that initiate adverse impacts
709 of NPs on living organisms. This work further paves the way for preliminary electrokinetics-based

710 assessment of NPs toxicity to microorganisms and for rapid pre-screening of eco-friendly
711 nanoparticulate materials.

712 ## 5. Supplementary material

713 TEM picture of $SiNH_2$ NPs (**Figure S1**), AFM peak force error images, taken in air, for F-pili (E2302)
714 bacteria at pH 7 (**Figure S2**), and illustration of the various steps followed for the evaluation of cells
715 surface roughness for YeeJ (E2551) strain at pH 7, for nude (E2152) strain at pH 3 in the presence of
716 $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) and for F-pili (E2302) strain at pH 3 in the presence of $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) (**Figures**
717 **S3**, **S4** and **S5**, respectively) are provided as supplementary material.

718

719 ## 6. Conflicts of interest

720 The authors declare no conflicts of interest.

721 ## 7. Acknowledgements

722 This research did not receive any specific funding.

723

724 ## References

725 El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2011. Surface
726 charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 283–287.
727 https://doi.org/10.1021/es1034188

728 Beaussart, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Chapot-Chartier, M.-P., Kulakauskas, S., Duval, J.F.L., 2018a.
729 Probing the influence of cell surface polysaccharides on nanodendrimer binding to Gram-
730 negative and Gram-positive bacteria using single-nanoparticle force spectroscopy. *Nanoscale* **10**,
731 12743–12753. https://doi.org/10.1039/c8nr01766b

732 Beaussart, A., Caillet, C., Bihannic, I., Zimmermann, R., Duval, J.F.L., 2018b. Remarkable reversal of
733 electrostatic interaction forces on zwitterionic soft nanointerfaces in a monovalent aqueous
734 electrolyte: An AFM study at the single nanoparticle level. *Nanoscale* **10**, 3181–3190.
735 https://doi.org/10.1039/c7nr07976a

736 Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A
737 physicochemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.* **218**, 48–68.
738 https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007

739 Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J., 2010. Escherichia coli biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 249–
740 389. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12

741 Beveridge, T.J., Graham, L.L., 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 684–705.

742 Bolshakova, A. V., Kiselyova, O.I., Yaminsky, I. V., 2004. Microbial surfaces investigated using atomic
743 force microscopy. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1615–1622. https://doi.org/10.1021/bp049742c

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M.F., Fiévet, F., 2006. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* **6**, 866–870. https://doi.org/10.1021/nl052326h

Chai, H., Yao, J., Sun, J., Zhang, C., Liu, W., Zhu, M., Ceccanti, B., 2015. The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94**, 490–495. https://doi.org/10.1007/s00128-015-1485-9

Chaveroche, M.K., Ghigo, J.M., D'Enfert, C., 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus Aspergillus nidulans. *Nucleic Acids Res.* **28**. https://doi.org/10.1093/nar/28.22.e97

Chen, Q., Yang, S., Li, Z., 1999. Surface roughness evaluation by using wavelets analysis. *Precis. Eng.* **23**, 209–212. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-6359(99)00013-6

Choi, O., Yu, C.-P., Esteban Fernández, G., Hu, Z., 2010. Interactions of nanosilver with Escherichia coli cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* **44**, 6095–6103. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.069

Colvin, V.L., 2004. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* **22**, 760–760. https://doi.org/10.1038/nbt0604-760c

Costa, T.R.D., Ilangovan, A., Ukleja, M., Redzej, A., Santini, J.M., Smith, T.K., Egelman, E.H., Waksman, G., 2016. Structure of the bacterial sex F pilus reveals an assembly of a stoichiometric protein-phospholipid complex. *Cell* **166**, 1436–1444. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.025

Crucho, C.I.C., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2017. Functional group coverage and conversion quantification in nanostructured silica by 1 H NMR. *Anal. Chem.* **89**, 681–687. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03117

Dague, E., Duval, J., Jorand, F., Thomas, F., Gaboriaud, F., 2006. Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis. *Biophys. J.* **90**, 2612–2621. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.068205

Delgado, A. V., González-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., Lyklema, J., 2005. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **77**, 1753–1805. https://doi.org/10.1351/pac200577101753

Diallo, M.S., Christie, S., Swaminathan, P., Balogh, L., Shi, X., Um, W., Papelis, C., Iii, W.A.G., Johnson, J.H., 2004. Dendritic chelating agents. 1. Cu(II) binding to ethylene diamine core Poly(amidoamine) dendrimers in aqueous solutions. *Langmuir* **20**, 2640–2651. https://doi.org/10.1021/la036108k

Dubey, R.V., Maheshwari, D.K., 1999. A textbook of microbiology. S. Chand Publishing.

Dufrêne, Y.F., 2008. Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 674–680. https://doi.org/10.1038/nrmicro1948

Duval, J.F.L., 2017. Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles: A dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 11802–11815. https://doi.org/10.1039/c7cp01750b

Duval, J.F.L., Farinha, J.P.S., Pinheiro, J.P., 2013. Impact of electrostatics on the chemodynamics of highly charged metal−polymer nanoparticle complexes. *Langmuir* **29**, 13821–13835. https://doi.org/10.1021/la403106m

Duval, J.F.L., Gaboriaud, F., 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 184–195.

https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.002

Duval, J.F.L., Leermakers, F.A.M., Van Leeuwen, H.P., 2004. Electrostatic interactions between double layers: Influence of surface roughness, regulation, and chemical heterogeneities. *Langmuir* **20**, 5052–5065. https://doi.org/10.1021/la030404f

Duval, J.F.L., Ohshima, H., 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* **22**, 3533–3546. https://doi.org/10.1021/la0528293

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J.M., Merlin, C., Beloin, C., Duval, J.F.L., 2011. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of escherichia coli cells subjected to osmotic stress. *PLoS One* **6: e20066**. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020066

Geusebroek, J., Smeulders, A.W.M., van de Weijer, J., 2003. Fast anisotropic gauss filtering **12**, 938–943.

Hardij, J., Cecchet, F., Berquand, A., Gheldof, D., Chatelain, C., Mullier, F., Chatelain, B., Hardij, J., Cecchet, F., Berquand, A., Gheldof, D., Chatelain, C., 2013. Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: Comparison of air-tapping-mode AFM and liquid Peak Force AFM. *J. Extracell. Vesicles* **3078**. https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.21045

Hartlen, K.D., Athanasopoulos, A.P.T., Kitaev, V., 2008. Facile preparation of highly monodisperse small silica spheres (15 to >200 nm) suitable for colloidal templating and formation of ordered arrays. *Langmuir* **24**, 1714–1720. https://doi.org/10.1021/la7025285

Hayden, S.C., Zhao, G., Saha, K., Phillips, R.L., Li, X., Miranda, O.R., Rotello, V.M., El-Sayed, M.A., Schmidt-Krey, I., Bunz, U.H.F., 2012. Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 6920–6923. https://doi.org/10.1021/ja301167y

Hill, R.J., Saville, D.A., Russel, W.B., 2003. Electrophoresis of spherical polymer-coated colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* **258**, 56–74. https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00043-7

Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., Hao, B., 2008. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* **24**, 4140–4144. https://doi.org/10.1021/la7035949

Ikuma, K., Decho, A.W., Lau, B.L.T., 2015. When nanoparticles meet biofilms-interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front. Microbiol.* **6**, 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00591

Ingale, A.G., Chaudhari, A.N., 2013. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications : an eco-friendly approach. *Nanomedecine Nanotechnol.* **4**. https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000165

Jacobson, K.H., Gunsolus, I.L., Kuech, T.R., Troiano, J.M., Melby, E.S., Lohse, S.E., Hu, D., Chrisler, W.B., Murphy, C.J., Orr, G., Geiger, F.M., Haynes, C.L., Pedersen, J.A., 2015. Lipopolysaccharide density and structure govern the extent and distance of nanoparticle interaction with actual and model bacterial outer membranes. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 10642–10650. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01841

Jandt, K.D., 2001. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surf. Sci.* **491**, 303–332. https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01296-1

Jiang, W., Yang, K., Vachet, R.W., Xing, B., 2010. Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy. *Langmuir* **26**, 18071–18077. https://doi.org/10.1021/la103738e

Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* **400**, 396–414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Kimkes, T.E.P., Heinemann, M., 2018. Reassessing the role of the Escherichia coli CpxAR system in sensing surface contact. *PLoS One* **13**, 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207181

Kleinstreuer, N.C., Sullivan, K., Allen, D., Edwards, S., Mendrick, D.L., Embry, M., Matheson, J., Rowlands, J.C., Munn, S., Maull, E., Casey, W., 2016. Adverse outcome pathways: From research to regulation scientific workshop report. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **76**, 39–50. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.01.007

Li, N., Zeng, S., He, L., Zhong, W., 2010. Probing nanoparticle-protein interaction by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **82**, 7460–7466. https://doi.org/10.1021/ac101627p

van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**, 75–87.

López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-González, D., 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interface Sci.* **283**, 344–351. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186

López-Viota, J., Mandal, S., Delgado, A. V., Toca-Herrera, J.L., Möller, M., Zanuttin, F., Balestrino, M., Krol, S., 2009. Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *J. Colloid Interface Sci.* **332**, 215–223. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.077

Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., Gottesman, S., 2005. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**, 6770–6778. https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6770-6778.2005

Malvern Instruments Limited, 2012. A basic guide to particle characterization. *White Pap.* 1–26. https://doi.org/10.1021/ac00110a016

Martinez-Gil, M., Goh, K.G.K., Rackaityte, E., Sakamoto, C., Audrain, B., Moriel, D.G., Totsika, M., Ghigo, J.M., Schembri, M.A., Beloin, C., 2017. YeeJ is an inverse autotransporter from Escherichia coli that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation. *Sci. Rep.* **7**, 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10902-0

Mathelié-guinlet, M., 2017. Etude de l'intéraction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur. Université de Bordeaux.

Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M.H., Cohen-Bouhacina, T., 2017. Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in Escherichia coli bacteria. *Adv. Colloid Interface Sci.* **245**, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.012

Mathelié-Guinlet, M., Grauby-Heywang, C., Martin, A., Février, H., Moroté, F., Vilquin, A., Béven, L., Delville, M.H., Cohen-Bouhacina, T., 2018. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of Escherichia coli, studied by AFM. *J. Colloid Interface Sci.* **529**, 53–64. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.098

Maurya, S.K., Gopmandal, P.P., Ohshima, H., 2018. Electrophoresis of concentrated suspension of soft

873 particles with volumetrically charged inner core. *Colloid Polym. Sci.* **296**, 721–732.
874 https://doi.org/10.1007/s00396-018-4292-0

875 McBroom, A.J., Kuehn, M.J., 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a
876 novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **63**, 545–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-
877 2958.2006.05522.x

878 Mecke, A., Majoros, I.J., Patri, A.K., Baker, J.R., Banaszak Holl, M.M., Orr, B.G., 2005. Lipid bilayer
879 disruption by polycationic polymers: The roles of size and chemical functional group. *Langmuir*
880 **21**, 10348–10354. https://doi.org/10.1021/la050629l

881 Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological
882 identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779–786.
883 https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207

884 Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic
885 environment? *Environ. Int.* **32**, 967–976. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014

886 Moussa, M., Caillet, C., Town, R.M., Duval, J.F.L., 2015. Remarkable electrokinetic features of charge-
887 stratified soft nanoparticles: Mobility reversal in monovalent aqueous electrolyte. *Langmuir* **31**,
888 5656–5666. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01241

889 Neal, A.L., 2008. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential
890 consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology* **17**, 362–371.
891 https://doi.org/10.1007/s10646-008-0217-x

892 Ohshima, H., 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **62**, 189–235.
893 https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00279-Y

894 Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P., 2012. Role of electrostatic
895 interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward Escherichia coli. *Colloids*
896 *Surfaces B Biointerfaces* **92**, 315–321. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.12.012

897 Peulen, T.O., Wilkinson, K.J., 2011. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **45**,
898 3367–3373. https://doi.org/10.1021/es103450g

899 Phillips, R.L., Miranda, O.R., You, C.C., Rotello, V.M., Bunz, U.H.F., 2008. Rapid and efficient
900 identification of bacteria using gold-nanoparticle-poly(para-phenyleneethynylene) constructs.
901 *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 2590–2594. https://doi.org/10.1002/anie.200703369

902 Planchon, M., Ferrari, R., Guyot, F., Gélabert, A., Menguy, N., Chanéac, C., Thill, A., Benedetti, M.F.,
903 Spalla, O., 2013. Interaction between Escherichia coli and TiO2 nanoparticles in natural and
904 artificial waters. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 158–164.
905 https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.034

906 Reisner, A., Haagensen, J.A.J., Schembri, M.A., Zechner, E.L., Molin, S., 2003. Development and
907 maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**, 933–946. https://doi.org/3490
908 [pii]

909 Ribeiro, T., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2017. Artefact-free evaluation of metal enhanced fluorescence
910 in silica coated gold nanoparticles. *Sci. Rep.* **7**, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02678-
911 0

912 Ribeiro, T., Raja, S., Rodrigues, A.S., Fernandes, F., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2014. NIR and visible
913 perylenediimide-silica nanoparticles for laser scanning bioimaging. *Dye. Pigment.* **110**, 227–234.
914 https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.03.026

915 Rowenczyk, L., Duclairoir-poc, C., Barreau, M., Picard, C., Hucher, N., Orange, N., Grisel, M., Feuilloley,

M., 2017. Impact of coated TiO2-nanoparticles used in sunscreens on two representative strains of the human microbiota : Effect of the particle surface nature and aging. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **158**, 339–348. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.013

Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U., 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *J. Nanobiotechnology* **12**, 1–11. https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5

Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yue, Z.B., 2005. Production of extracellular polymeric substances from Rhodopseudomonas acidophila in the presence of toxic substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 216–222. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1990-6

Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **18**. https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103

Silva, T., Pokhrel, L.R., Dubey, B., Tolaymat, T.M., Maier, K.J., Liu, X., 2014. Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Sci. Total Environ.* **468–469**, 968–976. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.006

Silverman, P.M., 1997. Towards a structural biology of bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **23**, 423–429. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2411604.x

Škvarla, J., 2007. Hard versus soft particle electrokinetics of silica colloids. *Langmuir* **23**, 5305–5314. https://doi.org/10.1021/la0635451

Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69. https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5

Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L., Klabunde, K.J., 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* **18**, 6679–6686. https://doi.org/10.1021/la0202374

Svenson, S., 2009. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 445–462. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.023

Tajarobi, F., El-Sayed, M., Rege, B.D., Polli, J.E., Ghandehari, H., 2001. Transport of poly amidoamine dendrimers across Madin-Darby canine kidney cells. *Int. J. Pharm.* **215**, 263–267. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00679-7

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO2 nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6151–6156. https://doi.org/10.1021/es060999b

Velzeboer, I., Hendriks, A.J., Ragas, M.J., De Meent, D., 2008. Nanomaterials in the environment aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 1942–1947. https://doi.org/10.1897/07-509.1

Van Der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A.J.B., Lyklema, J., 1997. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **9**, 81–100. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(96)01340-9

Wang, Y.A., Yu, X., Silverman, P.M., Harris, R.L., Egelman, E.H., 2009. The structure of F-pili. *J. Mol. Biol.* **385**, 22–29. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.054

Yang, Y., Quensen, J., Mathieu, J., Wang, Q., Wang, J., Li, M., Tiedje, J.M., Alvarez, P.J.J., 2013. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag+ on the microbial community structure of activated sludge. *Water Res.* **48**, 317–325. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.046

Zeyons, O., Thill, A., Chauvat, F., Menguy, N., Cassier-Chauvat, C., Oréar, C., Daraspe, J., Auffan, M., Rose, J., Spalla, O., 2009. Direct and indirect CeO2 nanoparticles toxicity for Escherichia coli and Synechocystis. *Nanotoxicology* **3**, 284–295. https://doi.org/10.3109/17435390903305260

963 **Table**

964 **Table 1: Characteristics of the bacteria adopted in this work.**

Strains	Expressed surface appendages	Genotype	Antibiotic resistance	Antibiotics for culture	Reference
E2152 (nude)	no flagella, no YeeJ protein, no Ag43, no type 1 fimbriae, no F factor	MG1655_gfp_Δfli _Δflu::km_ΔfimA-H::zeo	Amp^R, Cm^R, Km^R, Zeo^R	Ampicillin (Amp): 100 µg mL^{-1} Kanamycin (Km): 50 µg mL^{-1}	(Francius *et al.* 2011)
E2551 (YeeJ)	no flagella, no Ag43, no type 1 fimbriae, no F factor, constitutive expression of YeeJ	MG1655_gfp_Δfli _ Δflu_ΔfimA-H::zeo_kmPcLyeeJ	Amp^R, Cm^R, Km^R, Zeo^R	Ampicillin: 100 µg mL^{-1} Kanamycin: 50 µg mL^{-1}	(Martinez-Gil *et al.* 2017)
E2302 (F+)	no flagella, no Ag43, no type 1 fimbriae, no YeeJ protein, constitutive expression of F-pili	MG1655_gfp_Δfli_Δ flu::km_ΔfimA-H::zeo_F'tet	Amp^R, Cm^R, Km^R, Zeo^R, Tet^R	Ampicillin: 100 µg mL^{-1} Tetracyclin (Tet): 50 µg mL^{-1}	(Francius *et al.* 2011)

965

966 **Table 2: Values of charge density ρ_0 (in mM) and hydrodynamic penetration length $1/\lambda_0$ (in nm)**
967 obtained from **eqs 1-4** adopted to recover the electrokinetic data given in **Figure 1**. ρ_0 is expressed in
968 molar concentration of equivalent monovalent cationic or anionic charges (depending on pH), *i.e.* the
969 ratio between charge density (in C m^{-3}) and Faraday number.

$SiNH_2$ NPs	pH 3 and 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 9
ρ_0 (mM)	105	1.3	-17.7	-50.5	-73.7
$1/\lambda_0$ (nm)	0.74	1.07	1.00	1.11	1.30

970

971

972 **Table 3: Values of charge density ρ_0 and hydrodynamic penetration length $1/\lambda_o$** at different pH values
973 for the nude (E2152), YeeJ (E2551) and F-pili (E2302) strains obtained from Ohshima's model (**eqs 1-**
974 **4**). ρ_0 is expressed in molar concentration of equivalent monovalent anionic charges, *i.e.* from the ratio
975 between charge density (in C m^{-3}) and Faraday number.

	Nude (E2152)		YeeJ (E2551)		F-pili (E2302)	
	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7
ρ_o (mM)	-57.5	-195	-53.7	-92.5	-64.6	-101
$1/\lambda_o$ (nm)	0.91	0.51	0.85	0.88	0.85	0.83

976

977 **Table 4 : Values of the slopes ω corresponding to the linear plots σ_2 vs. σ_1 for nude (E2152), YeeJ**
978 **(E2551) and F-pili (E2302) cells at pH 7 and pH 3 in the absence or presence of $SiNH_2$ NPs (indicated).**
979 **Data correspond to mean values ± standard deviation as obtained from analysis of 3 to 7 cells per**
980 **examined condition. Data given at pH 3, without specification of standard deviation, correspond to**
981 **the analysis of 1 F-pili cell as we encountered significant difficulties in imaging more of these cells**
982 **under such pH condition, which is possibly due to AFM tip contamination by NPs and/or detached**
983 **F-pili structures during sample scanning (Figure S2).**

	pH 7	$SiNH_2$ NPs pH 7	pH 3	$SiNH_2$ NPs pH 3
Nude (E2152)	0.64 ± 0.13	0.79 ± 0.07	0.61 ± 0.07	1.26 ± 0.50
YeeJ (E2551)	1.23 ± 0.17	1.01 ± 0.14	1.96 ± 0.30	1.29 ± 0.80
F-pili (E2302)	1.43 ± 0.15	0.85 ± 0.18	1.15	1.73

984

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Electrophoresis as a simple method to detect deleterious actions of engineered nanoparticles on living cells

Elise Vouriot,[a] Isabelle Bihannic,[a,⊥] Audrey Beaussart, [a,⊥] Yves Waldvogel,[a]

Angelina Razafitianamaharavo,[a] Tania Ribeiro,[b] José Paulo S. Farinha,[b] Christophe Beloin,[c]

Jérôme F.L. Duval[a,*]

[a] Université de Lorraine, CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.

[b] Centro de Química-Física Molecular and IN - Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Instituto Superior Técnico, University of Lisbon, 1049-001, Lisboa, Portugal.

[c] Institut Pasteur, Unité Génétique des Biofilms, F-75724 Paris 15, France.

[⊥] These authors equally contributed to this work.

[*] Corresponding author: jerome.duval@univ-lorraine.fr

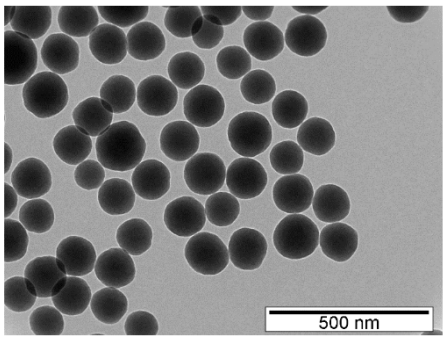


Figure S1: TEM picture of $SiNH_2$ NPs.

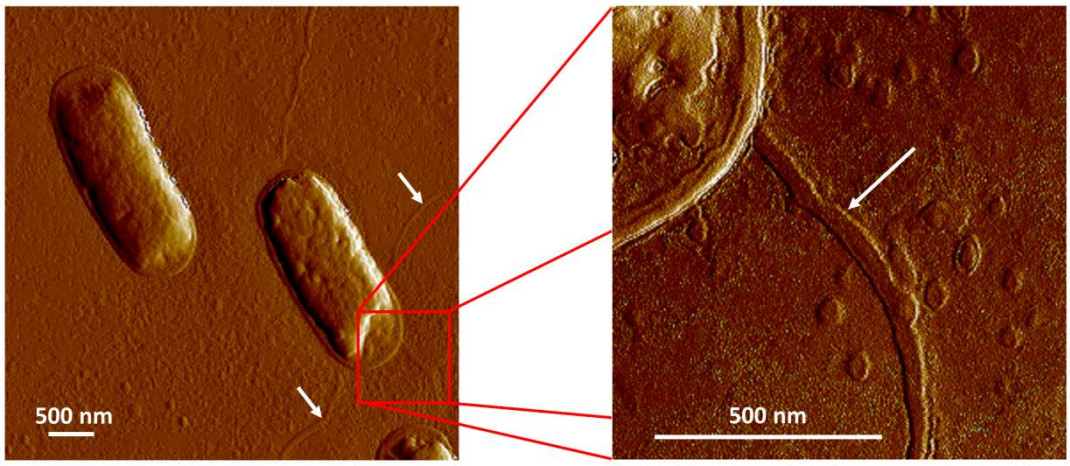


Figure S2: AFM peak force error images, taken in air, for F-pili (E2302) bacteria at pH 7. The image on the right is a × 5 zoom of the left image. White arrows correspond to F-pili.

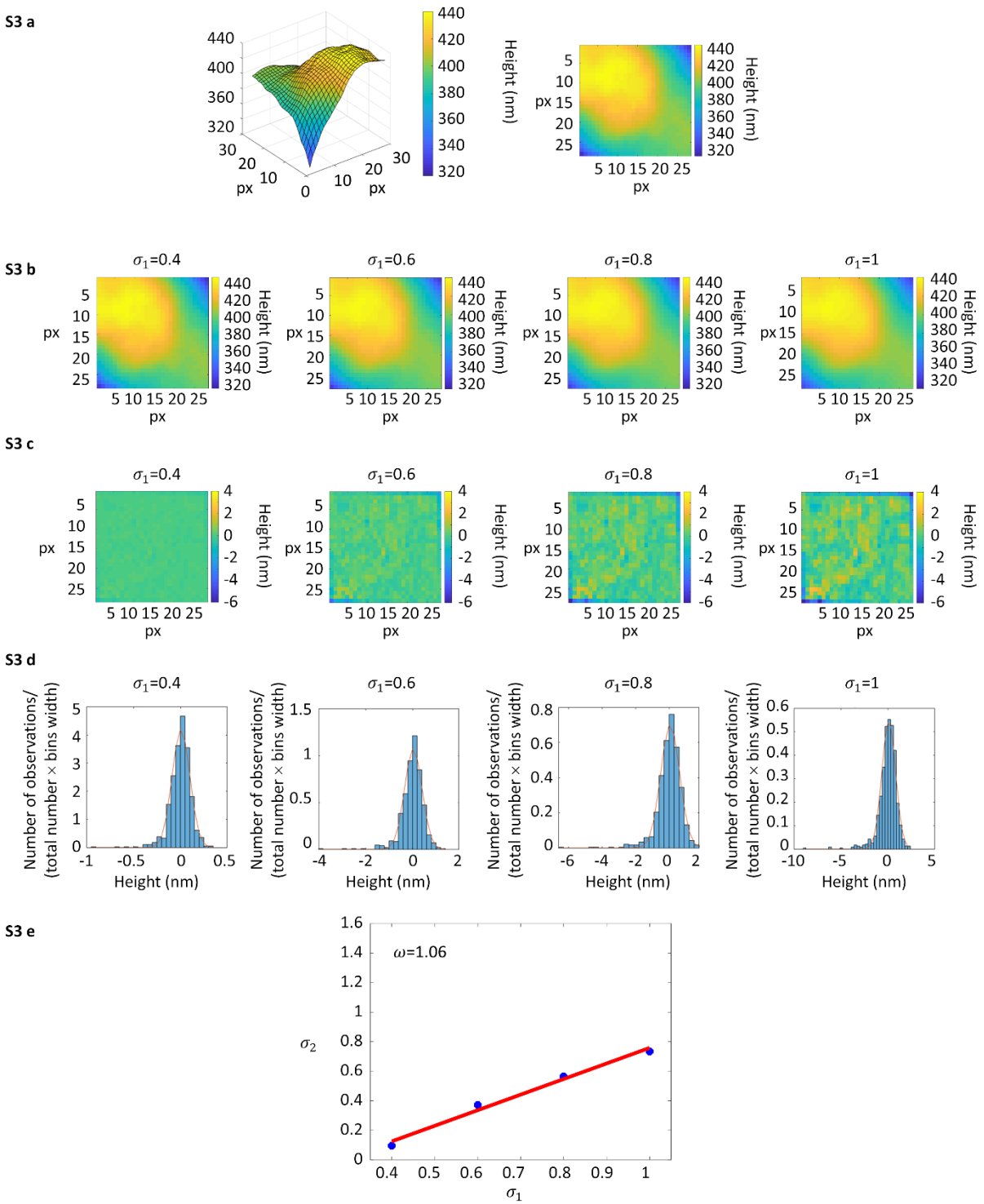


Figure S3: Illustration of the various steps followed for evaluation of cells surface roughness. The given example pertains to YeeJ (E2551) strain images at pH 7 in the absence of NPs (1 mM solution ionic strength). a: raw image in 3D (left) and 2D (right) (400 nm × 400 nm, 28 pixels × 28 pixels) taken from 3.5 µm × 3.5 µm, 256 pixels × 256 pixels AFM images (obtained under liquid conditions). b: images after application of a Gaussian filter defined by σ_1=0.4, 0.6, 0.8, 1 (indicated). c: images obtained after subtraction of the Gaussian-filtered images from the raw images at σ_1=0.4, 0.6, 0.8, 1

(indicated). d: distributions (given in the form of histograms) of the heights derived from images after subtraction at σ_1=0.4, 0.6, 0.8, 1 (indicated). Red curves: corresponding fits to normal distribution law (standard deviation σ_2). e: illustrative linear dependence of σ_2 versus σ_1 (slope ω). 'px' stands for pixels.

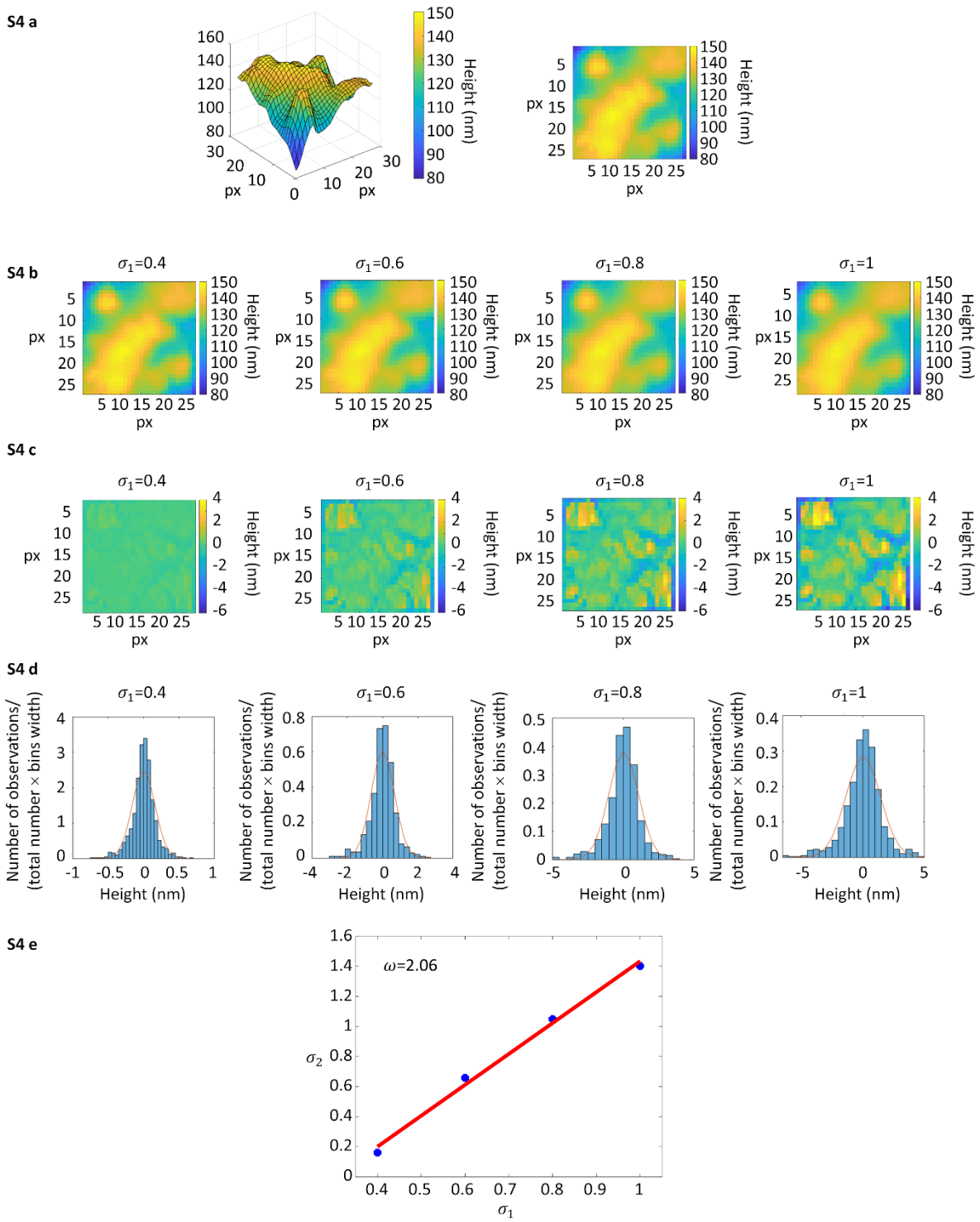


Figure S4: As in Figure S3, for the nude (E2152) strain imaged in the presence of $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) at pH 3 (2 mM solution ionic strength).

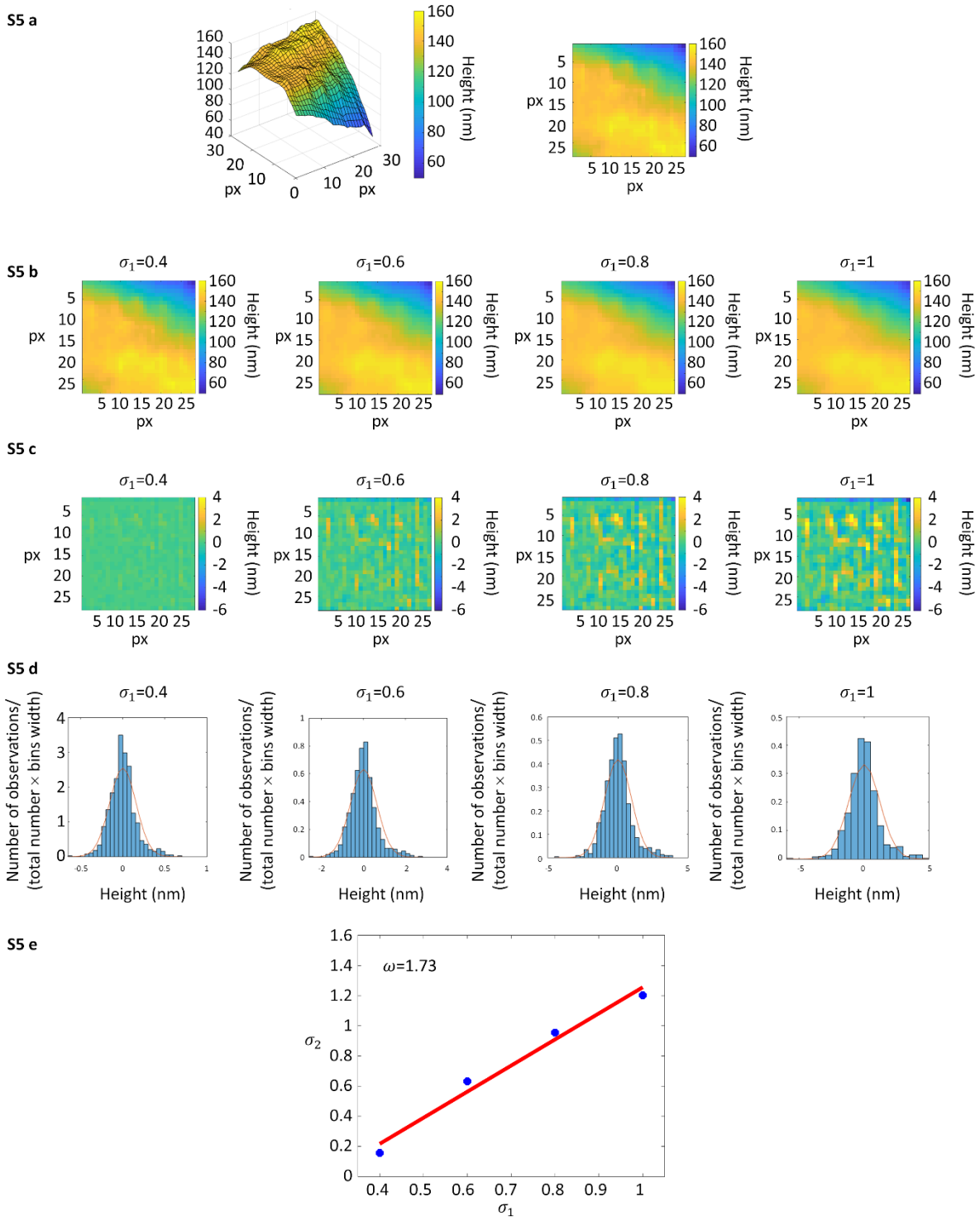


Figure S5: As in Figure S3, for the F-pili (E2302) strain imaged in the presence of $SiNH_2$ NPs (10^{-3} g L^{-1}) at pH 3 (2 mM solution ionic strength).

Expérimentations complémentaires

Dans un premier temps, la dépendance de la mobilité électrophorétique μ des NPs SiCOOH à la concentration en électrolyte KNO_3 a été déterminée sur la même gamme de force ionique que les NPs $SiNH_2$, aux pH 5, 7 et 9 au moyen d'un appareil NanoZS (Malvern®) (**Figure 39**). Il apparaît que la mobilité demeure négative sur toute la gamme de force ionique, quel que soit le pH.

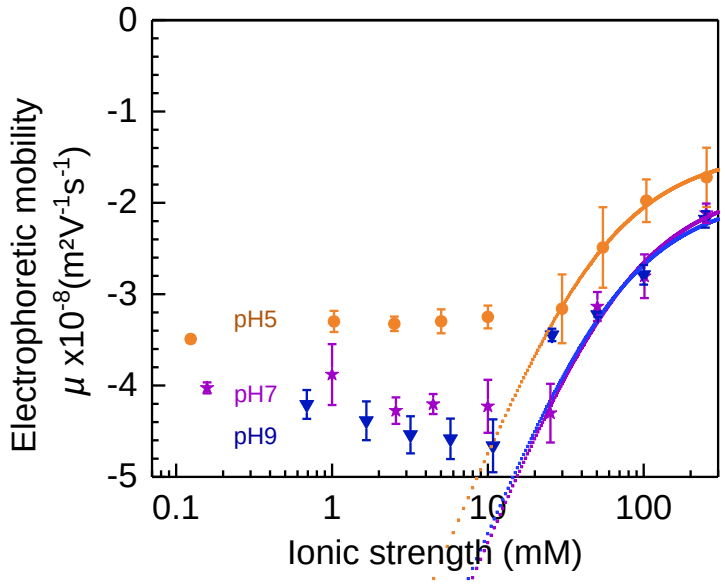


Figure 39 : Mobilité électrophorétique des NPs SiCOOH en fonction du pH (indiqué sur la figure) et de la force ionique de la solution de KNO3. Les symboles de couleur correspondent aux données expérimentales. Les lignes correspondent à une reconstruction des données au moyen de la théorie d'Ohshima. Les mesures ont été effectuées sur un équipement Zetasizer NanoZS entre 2 et 3 fois sur des suspensions de NPs SiCOOH nouvellement préparées, et chacune de ces mesures a été efectuée en trois exemplaires.

Pour les pH 5 à 9, la charge négative des NPs SiCOOH provient de la dissociation de leurs groupements surfaciques –COOH et –OH. De manière similaire aux NPs $SiNH_2$, $|\mu|$ augmente avec la décroissance de force ionique de 100 mM à 10 mM du fait de l'écrantage des charges de surface des NPs induit par l'augmentation de la concentration en électrolytes du milieu. De même que pour les NPs $SiNH_2$, pour une force ionique inférieure à 10 mM, μ semble devenir indépendante de la concentration en électrolytes. Comme expliqué dans le corps de l'article, cela peut provenir d'effets de polarisation de la DCE (Duval *et al.* 2013). En outre, à pH 9, $|\mu|$ tend à diminuer entre 10 mM et 0,1 mM. Cela provient potentiellement d'un effet de répulsion entre les charges situées à la surface des particules, entrainant

un gonflement de la couche superficielle de polyélectrolytes, sur laquelle la friction exercée par le flux électro-osmotique est accrue. Cela peut induire une diminution de $|\mu|$ avec la diminution de la force ionique du milieu et des valeurs de pH suffisamment élevées (Duval *et al.* 2013).

De la même manière que dans l'article, l'analyse quantitative des propriétés électrophorétiques des NPs SiCOOH a été effectuée pour une force ionique supérieure à 10 mM aux trois pH considérés (**Tableau 6**). L'application du modèle physique d'Ohshima (Ohshima 1995) montre que la charge des NPs est effectivement négative et que ρ_0 est de -111 ± 18,1 mM. La longueur de pénétration hydrodynamique $1/\lambda_0$ est, comme pour les NPs $SiNH_2$, différente de 0. Les NPs SiCOOH sont donc également à considérer comme des particules molles, du fait d'une couche de polyélectrolytes à la surface des NPs abritant les groupements de surfaces –COOH et –OH. La longueur de pénétration hydrodynamique semble être relativement constante quel que soit le pH ($1/\lambda_0$ = 1,23 ± 0,07 nm).

Tableau 6 : Valeurs de densité de charge ρ_0 (mM) et de la longueur de pénétration hydrodynamique $1/\lambda_0$ (nm) obtenues à partir des équations 1-4 (*cf.* Article) du modèle physique analytique d'Ohshima. ρ_0 est exprimé en concentration molaire de charges cationiques ou anioniques monovalentes équivalentes (dépendant du pH), ce qui correspond ratio entre la densité de charge ($C.m^{-3}$) et le nombre de Faraday.

NPs SiCOOH	pH 5	pH 7	pH 9
ρ_0 (mM)	-91,8	-128	-112
$1/\lambda_0$ (nm)	1,23	1,17	1,30

Par ailleurs, des mesures de taille des NPs à pH 7 ont montré que les suspensions de SiCOOH sont stables (**Figure 40**). Pour une force ionique comprise entre 0,1 et 250 mM, la distribution de taille des NPs est monomodale. Le diamètre hydrodynamique est de 130 ± 5 nm, ce qui correspond aux mesures obtenues par MET (**Figure S1 article**). La stabilité de la suspension provient des interactions électrostatiques répulsives entre NPs, dues à leur charge de surface négative. Ainsi, une barrière énergétique est établie et empêche l'agrégation des NPs.

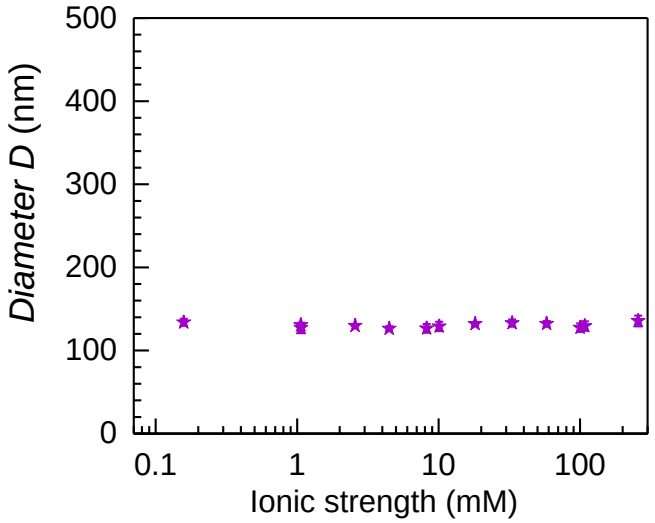


Figure 40 : Diamètre hydrodynamique D des NPs SiCOOH à pH 7 en fonction de la force ionique de la solution de KNO_3.

Concernant les systèmes binaires NPs SiCOOH/bactéries YeeJ (E2551), il s'avère qu'à pH 7 les distributions de mobilité des NPs SiCOOH et des YeeJ (E2551) se situent dans la même gamme, entre -4 et -3 $\times 10^{-8}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$ (**Figure 3a Article** et **Figure 39 et 41**). Lors de leur mise en solution, quel que soit la concentration en NPs, aucune déformation majeure de la plume de mobilité n'est à constater (**Figure 41**). Il est impossible de discerner dans quelle mesure la présence des NPs implique, ou non, des modifications structurales des bactéries ou, à l'inverse, si les protéines YeeJ de la paroi bactérienne recouvrent les NPs. La détection des modifications structurales par le biais de l'électrophorèse n'est pas possible pour des systèmes où les mobilités électrophorétiques des deux types de particules en présence ne sont pas suffisamment éloignées. Il est cependant envisageable que, du fait de la charge négative des bactéries YeeJ (E2551) et des NPs SiCOOH, les propriétés électro-hydrodynamiques des bactéries ne sont pas affectées par la présence de ces NPs, de manière similaire à ce qui a été précédemment observé avec les NPs $SiNH_2$.

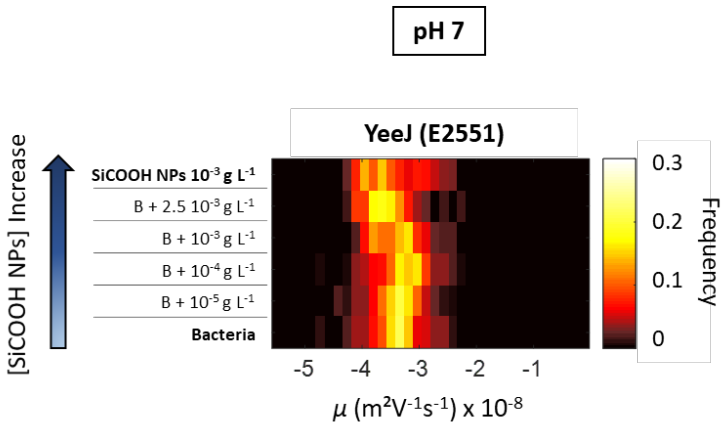


Figure 41 : Signatures électrophorétiques de suspensions mixtes de NPs SiCOOH et bactéries à pH 7 en fonction de la concentration de NPs SiCOOH en solution pour les bactéries E2551 présentant la protéine de surface YeeJ. La force ionique de la solution de KNO est de 1 mM. 'B' signifie bactéries.

Pour des systèmes NPs/bactéries où les particules possèdent des valeurs de mobilité dans des gammes distinguables, l'électrophorèse permet de détecter les signatures des modifications structurales induites par des interactions électrostatiques. Son application relativement simple permet ainsi d'appréhender les mécanismes d'interactions se déroulant dans une suspension de cellules bactériennes et de NPs lors de leurs premiers stades d'interaction. Cette application de l'électrophorèse constitue une nouvelle étape pour la compréhension des mécanismes de dissémination des NPs au sein de l'environnement.

Chapitre 4 : L'holotomographie comme technique d'analyse de la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs

I. Choix des souches pour l'étude des biofilms 150

II. Holotomographie des biofilms bactériens 151

1. Processus de traitement des données 152

2. Redimensionnement des images en (X, Y) 156

3. Détermination de la zone d'analyse selon Z 156

4. Critère d'Otsu 157

5. Epaisseur du biofilm 159

6. Occupation 160

7. Densité 161

8. Taux de couverture 162

9. Filtre des volumes 162

10. Etude des volumes 165

11. Etude par tranche bactérienne 166

III. Effet des NPs sur la structuration des biofilms 168

1. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules 170

1.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 170

1.2 Etude des domaines 174

2. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence d'une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$ de NPs $SiNH_2$ 180

2.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 180

2.2 Etude des domaines 183

3. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence de 0,4 $g.L^{-1}$ de NPs SiCOOH 189

3.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité 189

3.2 Etude des domaines 192

4. Etude comparative 197

Un biofilm est une communauté de bactéries planctoniques qui s'attachent et s'agrègent entre elles sur une interface solide-liquide en s'enveloppant d'une matrice protectrice hétérogène composée d'EPS. Le but initial de cette thèse était d'appréhender les interactions entre les nanoparticules et les bactéries soit sous forme planctonique soit organisées dans un biofilm, afin de corréler les interactions à l'échelle de la cellule unique et à l'échelle d'assemblages tridimensionnels.

Ce chapitre est un chapitre d'ouverture concernant l'analyse de la structure des biofilms bactériens exposés à des contaminants de type NPs, en utilisant l'holotomographie, une technologie combinant holographie et tomographie afin de fournir une cartographie des indices de réfraction d'objets tridimensionnels.

Dans cette partie seul un type de biofilm bactérien est présenté. Il s'agit de biofilms issus de YeeJ (E2551), et générés en présence de deux types de NPs, SiCOOH et $SiNH_2$, à une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$.

I. Choix des souches pour l'étude des biofilms

Afin de sélectionner les souches bactériennes les plus aptes à former des biofilms, un test préliminaire de coloration au cristal violet a été effectué sur les 8 souches retenues pour cette thèse (***cf.*** **Chapitre 2 § I.1 Tableau 1**). Ainsi, une solution à 1 % de cristal violet a été déposée sur des cultures bactériennes disposées dans une microplaque 96 puits à fond en verre. Après 24 h de culture, sans agitation, la DO_{570} est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS® afin de quantifier les bactéries n'ayant pas été éliminées suite à l'étape de rinçage, et qui sont par conséquent accrochées sur la surface en verre des puits. Le protocole de ce test est détaillé dans le **chapitre 2 § V.1.**

A l'issue de ce test, 3 souches ont montré des capacités plus importantes à former des biofilms. C'est-à-dire que la DO_{570} après rinçage des puits concernés est supérieure à 0,2, alors que les puits ne contenant pas de biofilms présentent une DO_{570} autour de 0. Ainsi, les souches E751 s*trong biofilm former*, souche contrôle de la formation des biofilms du fait de la pluralité de ses appendices de surface (fimbriae type I, pili-F et protéine surfacique Ag43), YeeJ (E2551) et pili-F (E2302) sont les souches capables de former des biofilms. Seuls des résultats concernant les E2551 sont présentés ici. En effet, la souche E751 est une souche contrôle et présente trop d'appendices de surface différents pour permettre d'isoler leur influence respective sur la construction du biofilm ou sur les interactions des bactéries avec les NPs. Lors des tests préliminaires, la souche YeeJ (E2551) s'est révélée être la seconde souche la plus apte à former des biofilms après la E751. Elle a donc été préférée à la souche pili-F (E2302). Les biofilms présentés ci-après croissent dans du milieu M63B1 glu (*ca.* 100 mM) à pH naturel (*ca.* 7).

II. Holotomographie des biofilms bactériens

Le but de ce chapitre est d'explorer le potentiel de la technologie de l'holotomographie pour étudier la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs. Ainsi, une méthode d'exploitation des données holotomographiques est proposée pour la détermination de différents proxys caractérisant la structure du biofilm de bactéries seules et générés en présence de NPs.

La microscopie confocale est la technique privilégiée pour analyser la structure des biofilms et la répartition de contaminants en leur sein (Choi *et al.* 2010; Nevius *et al.* 2012). Cependant, l'utilisation d'un microscope confocal nécessite une sonde fluorescente, la fluorescence pouvant déjà être présente dans l'objet à observer, ou provenir d'un marqueur utilisé pour identifier une fonction ou un compartiment cellulaire (Bridier *et al.* 2014). Comme expliqué dans le **chapitre 2 VI.**, l'holotomographie permet d'explorer les tissus vivants de façon quantitative, dynamique et non-invasive en utilisant un laser pour scanner en 3D la distribution des indices de réfraction (RI) dans les cellules (Kim *et al.* 2017; Yang *et al.* 2013a). Elle combine l'holographie, technique quantitative permettant d'accéder à la phase de l'onde lumineuse, et la tomographie, qui permet de reconstruire le volume de l'objet imagé en superposant les hologrammes 2D. Un volume recalculé des RI est ensuite obtenu par le biais d'un algorithme de reconstruction de l'image (Kim *et al.* 2016a; Lee *et al.* 2019, 2013a; Yoon *et al.* 2017).

Il n'est donc pas obligatoire d'utiliser une sonde fluorescente, altérant potentiellement les caractéristiques de l'objet observé (Kim *et al.* 2017). Durant cette thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler avec cette nouvelle technologie d'analyse d'objets biologiques 3D. Les deux constructeurs commercialisant à ce jour les holotomographes, Nanolive® et Tomocube®, nous ont permis de tester cette technologie sur nos biofilms bactériens.

Quelques différences notables existent entre les équipements proposés par les deux sociétés. Sur l'appareil de Tomocube®, l'échantillon est placé entre un condenseur, permettant de concentrer la lumière sur l'échantillon et de minimiser les aberrations optiques, et un objectif à grossissement $\times 60$. Un laser passe à travers un jeu de miroir et ce laser tourne autour de l'échantillon. L'holotomographe de Nanolive® ne possède pas de condenseur ce qui permet en contrepartie d'observer des échantillons plus larges. Par ailleurs, c'est le miroir, fixé sur un bras pivotant, qui fait tourner le laser autour de l'échantillon. Préférant privilégier la netteté de l'image, nous avons décidé de présenter les analyses effectuées sur les données obtenues à l'aide de l'appareil de Tomocube®. Les échantillons examinés sont des biofilms constitués uniquement de bactéries YeeJ (E2551), mais également de bactéries YeeJ (E2551) en présence de NPs $SiNH_2$ ou SiCOOH à une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$.

1. Processus de traitement des données

Les données obtenues sont des volumes constitués d'images 2D empilées (*stacks*) extraits à l'aide du logiciel associé à l'holotomographe, Tomostudio®. Les dimensions initiales de ces volumes sont de 808 pixels (px) en X et en Y et 206 px en Z, soit *ca.* 78 µm en X et Y et 40 µm en Z. Initialement, le volume est recalculé pour fournir une cartographie des indices de réfraction de l'échantillon (***cf.* Chapitre 2 VI.**). Cependant, lors de l'exportation des données vers un format exploitable (en TIFF), l'image est convertie en niveaux de gris, codés sur 8-bits. Ainsi chaque pixel constituant l'image présente une valeur entière comprise entre 0 et 255. Les volumes sont ensuite exploités à l'aide du logiciel Matlab afin de déterminer les proxys permettant de caractériser la structure des biofilms.

L'ensemble de la procédure suivie pour exploiter ces données et étudier les paramètres sélectionnés est résumé ci-après sous forme de logigrammes (**Figure 42, 43 et 44**). Dans un premier temps, sont présentées les différentes étapes de traitement de l'image, nécessaires au traitement des holotomogrammes (**§ II.2, 3, 4**). Dans un deuxième temps, est exposée (**§ II.5, 6, 7, 8**) la procédure d'obtention, à partir d'images binarisées, d'un premier ensemble de proxys comprenant : les projections d'intensité maximale (MIP) des pixels 3D, les critères d'épaisseur, d'occupation des pixels, de densité et de taux de couverture. Enfin, un ensemble de proxys basés sur l'analyse de volume des domaines est détaillé (**§ II.9, 10, 11**).

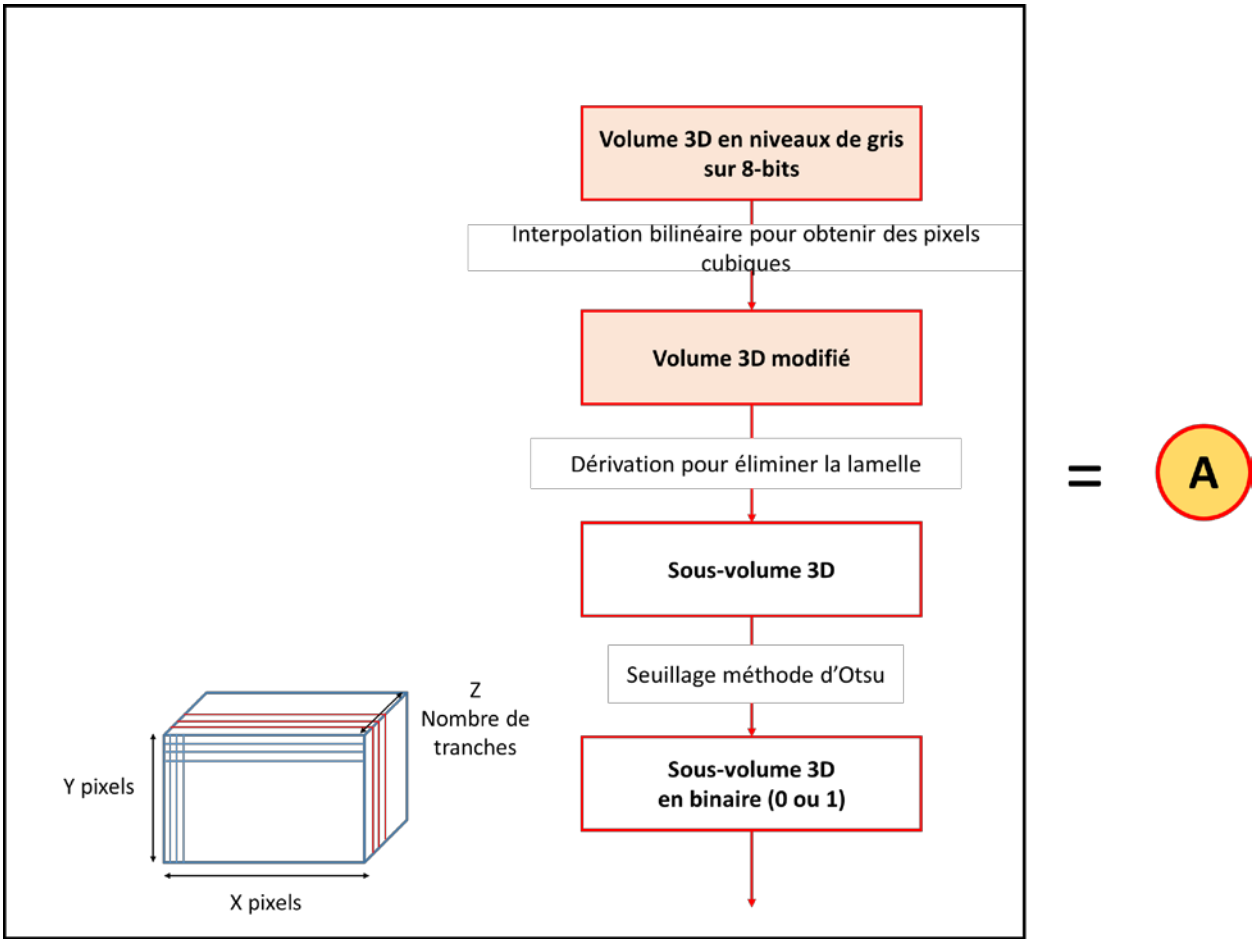


Figure 42 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 1. Ce logigramme est désigné ensuite par la lettre « A ».

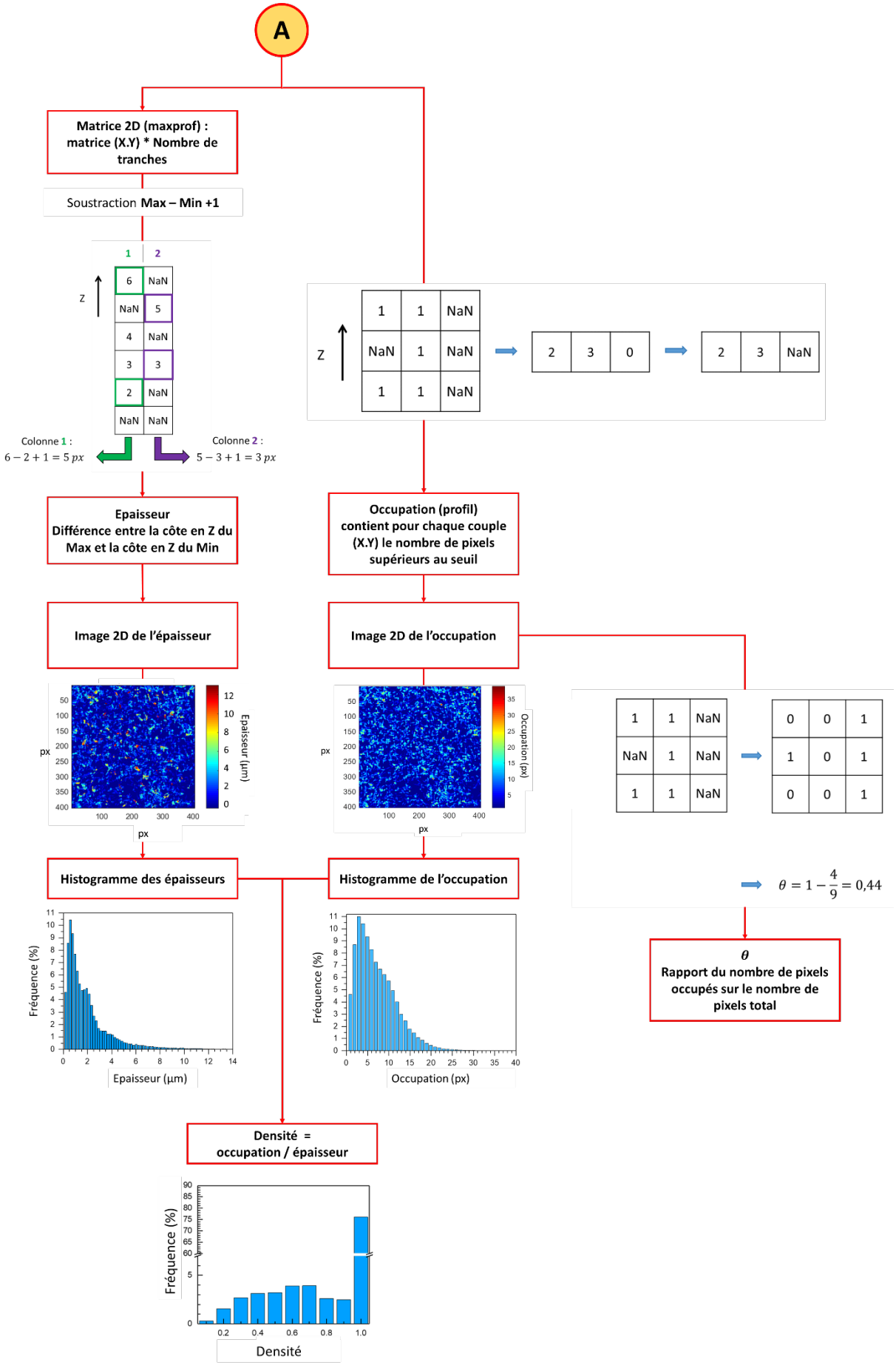


Figure 43 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 2. « A » représente le logigramme en Figure 42.

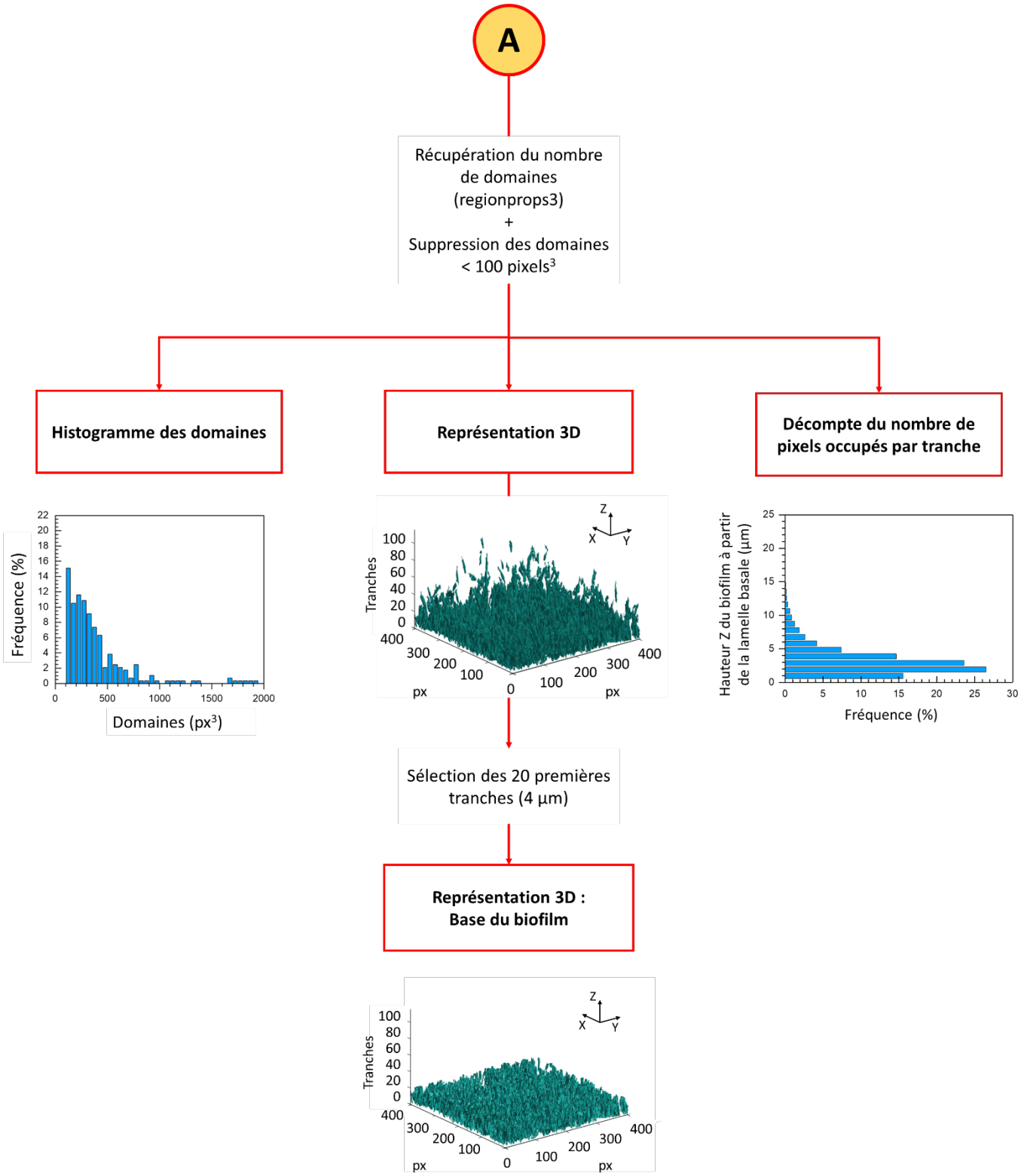


Figure 44 : Logigramme résumant la procédure d'obtention des différents paramètres d'étude des biofilms - Partie 3. « A » représente le logigramme en Figure 42.

2. Redimensionnement des images en (X, Y)

Sur l'holotomographe de Tomocube®, les tailles des pixels en (X,Y) sont différentes de l'écart entre deux tranches (selon Z). Un pixel mesure 97 nm selon les axes X et Y, tandis que selon Z les tranches sont séparées de 194 nm. Il est donc nécessaire de procéder à un redimensionnement des pixels afin d'effectuer le traitement d'images à partir de voxels cubiques. L'opération consiste à remplacer 4 pixels 2 à 2 adjacents, dans un plan (X, Y), par 1 pixel unique obtenu par une opération d'interpolation bilinéaire (**Figure 45**).

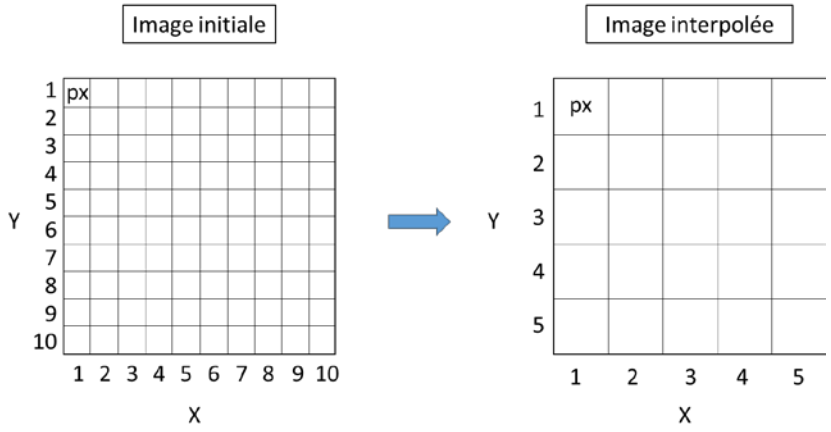


Figure 45 : Opération d'interpolation bilinéaire

3. Détermination de la zone d'analyse selon Z

Le volume reconstruit présente une symétrie par rapport à la lamelle où se trouve le biofilm. Il existe donc nécessairement des tranches où le biofilm est absent, ce qui les rend inutiles. Ainsi, en-dessous d'un certain plan que l'on détermine, les tranches superflues sont supprimées.

C'est dans ce but, sur l'image en niveaux de gris, codés sur 8-bits, que le MIP pour chaque rangée (ligne ou colonne selon le plan de projection choisi) est déterminé. La visualisation en MIP consiste à projeter le pixel d'intensité maximale pour permettre une visualisation en 2D. Ainsi, les pixels d'intensité maximale de chaque rangée sont inventoriés selon un axe défini, en fonction de la MIP voulue (XY, YZ ou XZ) (**Figure 46**). Pour déterminer la position Z limite, la somme des valeurs de ces pixels d'intensité maximale de chaque plan (X, Y) est placée dans un vecteur colonne. Un profil en (X, Z) est donc obtenu, puis il est dérivé (**Figure 47**). Le point maximum de la dérivée est choisi pour définir la tranche en position Z d'intérêt, à partir de laquelle le biofilm commence (ce qui correspond à la lamelle inférieure qui constitue le substrat (***cf.* Chapitre 2 § V.3 Figure 33**). Toutes les tranches avant cette position Z sont supprimées de l'image pour la suite du traitement. Les MIP permettent ainsi d'obtenir une visualisation grossière de la structure du biofilm selon (X, Y), (Y, Z) et (X, Z).

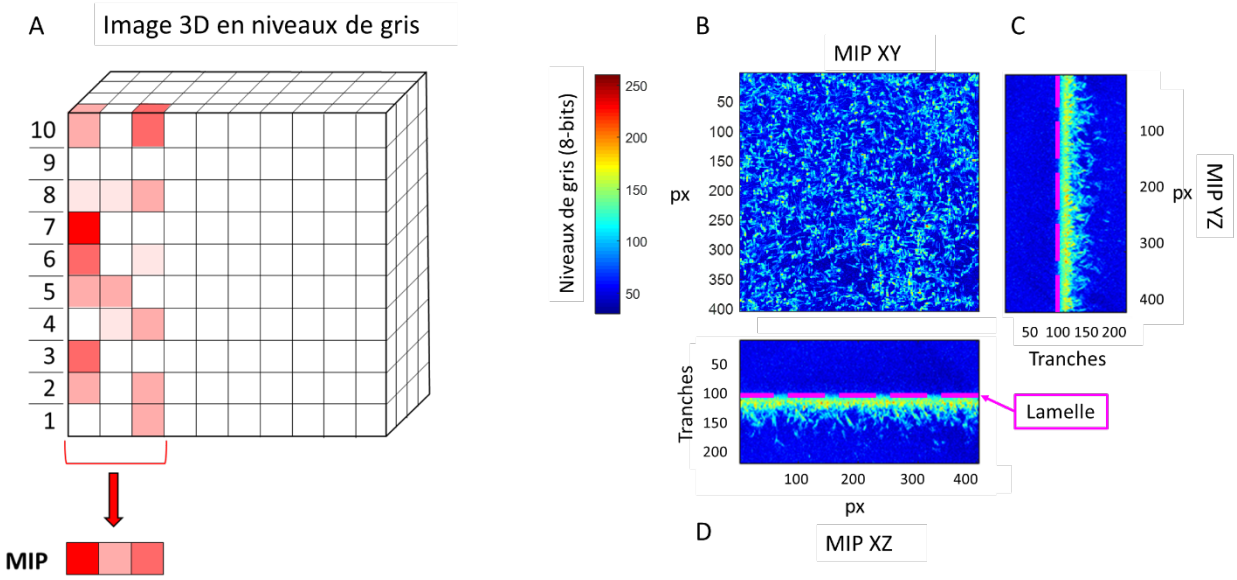


Figure 46 : A : Explications de l'obtention des MIP. B, C, D : Exemples de représentations des MIP selon les plans de projection (X, Y), (Y, Z) et (X, Z) d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551).

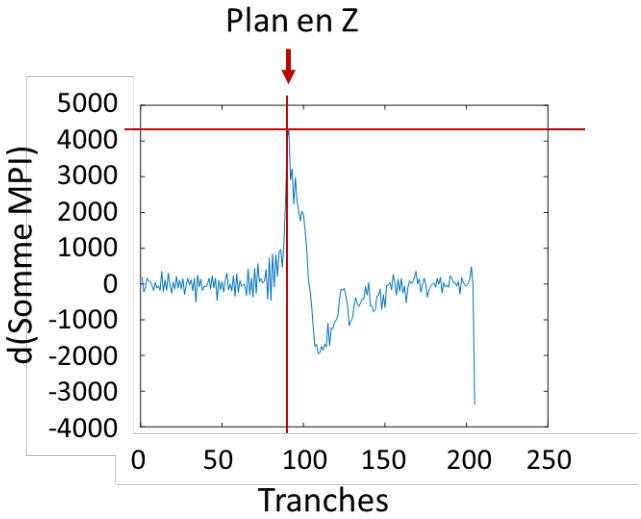


Figure 47 : Détermination du plan en Z en-dessous duquel le biofilm est considéré comme inexistant.

4. Critère d'Otsu

Pour traiter une image en niveaux de gris, il est nécessaire d'appliquer une méthode de segmentation permettant de séparer les pixels en 2 groupes, ceux qui appartiennent aux bactéries et aux NPs dans le premier plan B et les pixels de l'arrière-plan A (**Figure 48**). Une approche par classification des pixels sur histogramme par la méthode d'Otsu a été sélectionnée (Otsu 1979; Yerly *et al.* 2007; Zhang and Hu 2008). Elle permet de transformer une image en niveaux de gris en une image dont les valeurs des pixels sont réparties entre 2 classes, 0 ou 1. Cette méthode de seuillage est automatique et adaptative.

Toutes les valeurs possibles de seuil sont balayées, et pour chaque seuil, la moyenne (**Equation 11**) et la variance (**Equation 12**) correspondantes sont calculées jusqu'à obtenir un seuil optimal où la variance intra-classe σ_w (**Equations 11-14**), autrement qualifiée de moyenne des variances ou de variance résiduelle, est minimale.

$$\mu_A(i) = \frac{1}{\sum_{i=0}^{S-1} n_{g_s}} \sum_{i=0}^{S-1} g_i \times n_{g_i} \qquad \mu_B(i) = \frac{1}{\sum_{i=S}^{f} n_{g_s}} \sum_{i=S}^{f} g_i \times n_{g_i} \qquad \textbf{(11)}$$

$$\sigma_A^2(i) = \frac{1}{\sum_{i=0}^{S-1} n_{g_i}} \sum_{i=0}^{S-1} (g_i - \mu_A)^2 \times n_{g_i} \qquad \sigma_B^2(i) = \frac{1}{\sum_{i=S}^{f} n_{g_i}} \sum_{i=S}^{f} (g_i - \mu_B)^2 \times n_{g_i} \qquad \textbf{(12)}$$

$$P_A(i) = \frac{1}{n_{total}} \sum_{i=0}^{S-1} n_{g_i} \qquad P_B(i) = \frac{1}{n_{total}} \sum_{i=S}^{f} n_{g_i} \qquad \textbf{(13)}$$

$$\sigma_w^2 = P_A \times \sigma_A^2 + P_B \times \sigma_B^2 \qquad \textbf{(14)}$$

, P est le poids d'une classe, μ est la moyenne d'une classe, σ^2 est la variance d'une classe, σ_w est la variance intra-classe, le seuil optimal étant celui pour lequel σ_w est minimum, n_{g_i} correspond au nombre de pixels dans le groupe g_i associée, S est le seuil et f correspond au dernier niveau de gris. A (respectivement B) correspond à la classe désignée comme constituant l'arrière-plan (respectivement le premier plan) de l'image. Dans l'exemple **Figure 48**, le seuil S vaut 3 et le dernier niveau de gris f vaut 5. Ainsi, la méthode d'Otsu consiste à changer le seuil séparant les différentes classes jusqu'à obtenir une σ_w optimale. Cette opération permet de séparer les objets observés de l'arrière-plan, composé ici principalement de PBS.

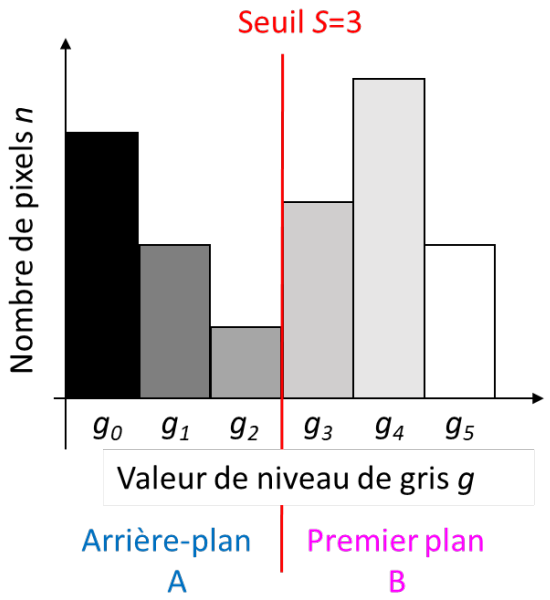


Figure 48 : Application de l'algorithme d'Otsu pour le seuillage automatique d'une image en niveaux de gris (adapté de (Greensted 2010))

5. Epaisseur du biofilm

Après seuillage, le volume est retraité pour que chaque pixel de valeur 1 soit remplacé par sa côte en Z. Les pixels valant 0 sont remplacés par des NaN (*Not-a-Number*), ce qui permet de les exclure des calculs statistiques effectués par la suite. Il est ainsi possible de déterminer la position du premier et du dernier pixel occupé sur chaque colonne. La différence de position additionnée de 1 permet de rendre compte d'une approximation de l'épaisseur du biofilm (**Figure 49**).

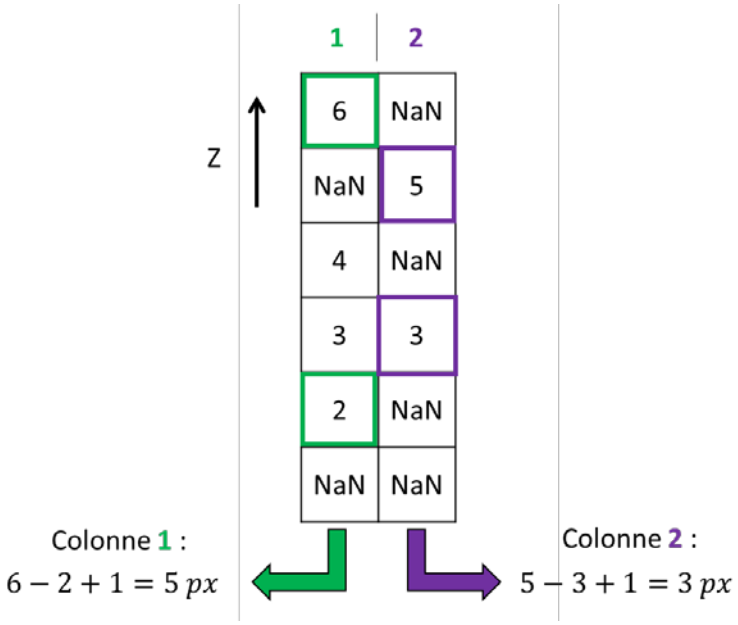


Figure 49 : Détermination de l'épaisseur d'un biofilm

Une image 2D aux dimensions de l'image bilinéarisée initiale représente cette distribution d'épaisseur (**Figure 50 A**) ainsi qu'un histogramme des épaisseurs, tracé sur la base de cette image (**Figure 50 B**). La largeur de chaque classe est de 0,194 µm. La fréquence rapportée pour une classe donnée de valeurs d'épaisseur correspond au rapport entre le nombre d'épaisseurs constituant cette classe, et le nombre total d'épaisseurs composant l'histogramme. Elle permet ainsi d'estimer la contribution de chaque barre de l'histogramme au sein de la distribution d'épaisseur. L'intégrale de cette distribution vaut donc 100.

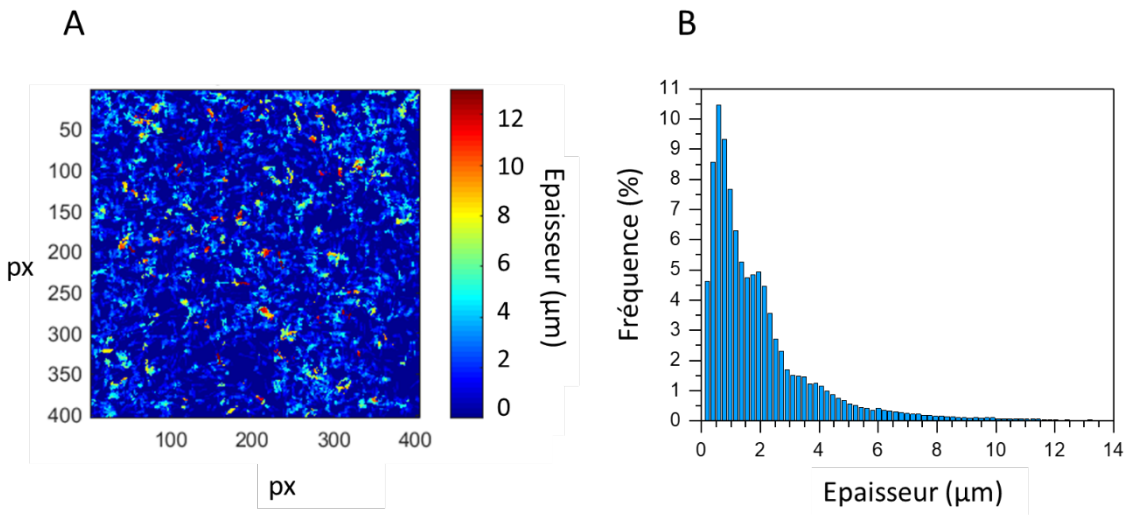


Figure 50 : Représentations de l'épaisseur dans un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D de l'épaisseur selon le plan (X, Y), B : Histogramme des épaisseurs.

6. Occupation

A partir de l'image 2D obtenue après seuillage, les pixels égaux à 1 sont sommés en Z (**Figure 51**).

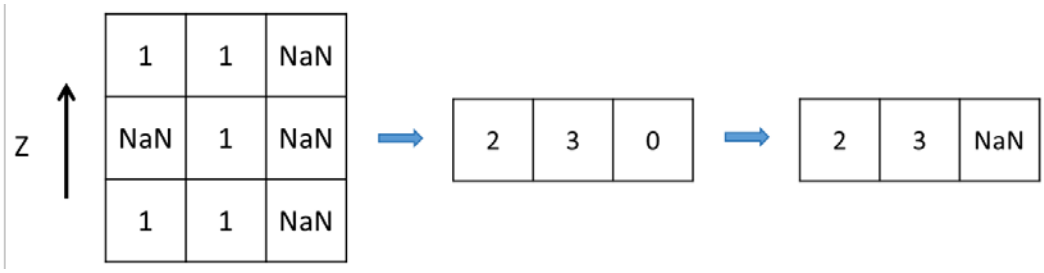


Figure 51 : Détermination de l'occupation d'un biofilm

En effet, l'épaisseur ne tient compte que des pixels occupés en position minimum et maximum. L'occupation rend compte de la quantité de pixels occupés dans cet intervalle minimum-maximum, et un histogramme des occupations (**Figure 52 B**) est tracé sur la base de l'image 2D (**Figure 52 A**). L'histogramme est normalisé de la même manière que pour l'épaisseur.

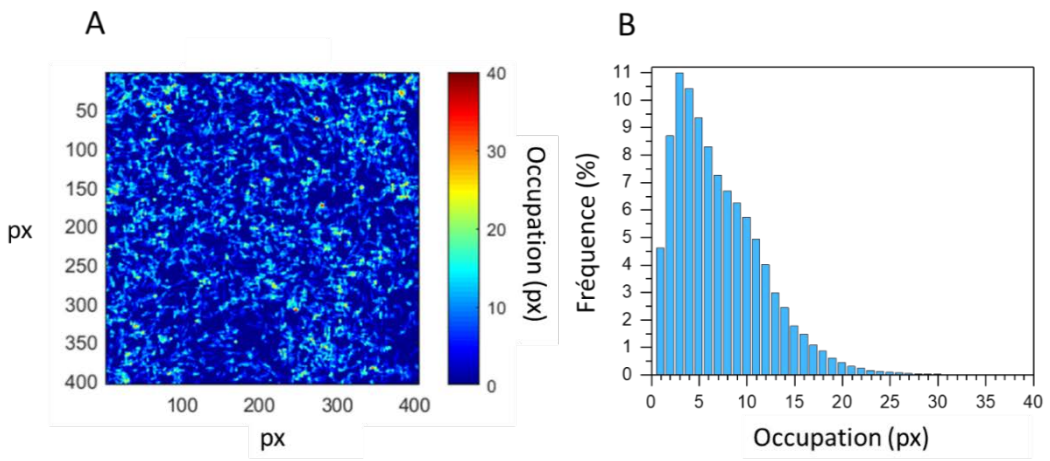


Figure 52 : Représentations de l'occupation dans un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme des occupations.

7. Densité

Afin de juger de la densité des biofilms, un calcul de densité de pixels d_{pix} (**Equation 15**) est effectué et présenté sous forme d'histogramme (**Figure 53**), normalisé de la même manière que l'épaisseur et l'occupation, tel que :

$$d_{pix} = \frac{T_{occ}}{E_p} \qquad \textbf{(15)}$$

, T_{occ} est l'occupation et E_p est l'épaisseur. Dans le cas où $T_{occ} = E_p$, $d_{pix} = 1$. Ainsi, plus d_{pix} tend vers 1, plus le biofilm est dense. Si E_p tend vers ∞, d_{pix} tend vers 0, et le biofilm est donc plus « aérien ».

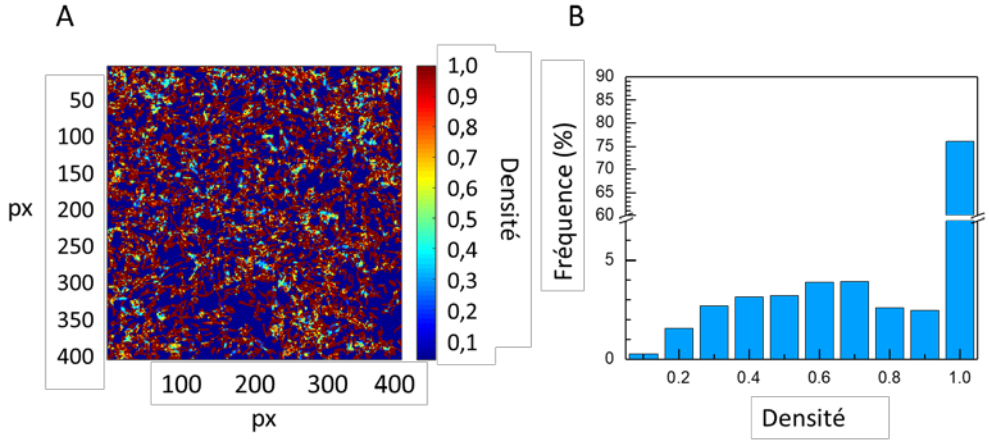


Figure 53 : Représentations de la densité d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité.

8. Taux de couverture

Le calcul d'un rapport θ (**Equation 16**) permet de quantifier le taux de couverture du biofilm sur le substrat, c'est-à-dire la proportion de l'espace occupé par le biofilm. Pour cela la quantité de pixels vides, après application du critère d'Otsu, est déterminée, à partir de l'image 2D de l'occupation (***cf.* logigramme Partie 2 Figure 43**). Ensuite, un rapport entre ce nombre de pixels vides et le nombre total de pixels est calculé et soustrait de 1 (**Figure 54**).

$$\theta = 1 - \frac{\sum pixels\ vides}{nombre\ total\ de\ pixels} \qquad \textbf{(16)}$$

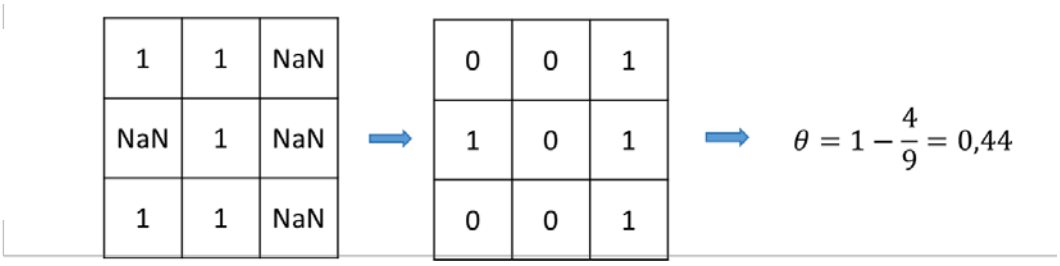


Figure 54 : Exemple de calcul de θ

9. Filtre des volumes

Afin de mesurer différentes propriétés de régions d'images volumétriques 3D, la fonction *regionprops3* de Matlab a été utilisée. La propriété « volume » estime le nombre de domaines constitués de pixels 26-connectés par défaut, *i.e.* chaque pixel cubique peut être connecté à un autre par au minimum une de ses 6 faces, ou 1 de ses 12 arêtes ou 1 de ses 8 coins (**Figure 55**). Dans la suite, l'utilisation du terme domaine désigne des volumes de pixels connectés.

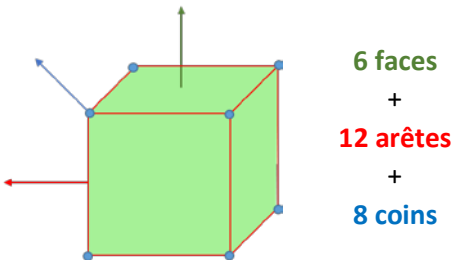


Figure 55 : Pixels 26-connectés

Cependant, la représentation 3D des domaines issus de cette fonction montre la nécessité d'appliquer un filtre pour supprimer les domaines constitués d'artefacts, de débris bactériens ou de bruit (**Figure 56 A**). Ainsi, il a été décidé d'estimer le volume d'une bactérie afin de déterminer un filtre de domaines à appliquer. Avec la fonction *regionprops3*, il est possible d'accéder à la longueur, au diamètre et au volume en voxels (ou px^3) des différentes bactéries considérées. Le volume d'une bactérie a également

été déterminé en la considérant comme un cylindre (Coles *et al.* 1975). Les moyennes de ces dimensions, ainsi que les écart-types associés, estimés sur 4 bactéries isolées provenant d'un échantillon composé de bactéries planctoniques, sont renseignés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Estimation de la longueur et du diamètre d'une bactérie selon *regionprops3* en px et en µm, et comparaison du volume d'une bactérie calculé par *regionprops3* et calculé en assimilant la forme d'une bactérie à un cylindre, à partir des longueur et diamètres déterminés par *regionprops3*, en px^3 et µm^3. Les calculs ont été effectués en considérant 4 bactéries provenant d'un échantillon composé de bactéries planctoniques.

Longueur	Diamètre	Volume *regionprops3*	Volume cylindre
11 ± 1,2 px	4,9 ± 0,6 px	254 ± 71,1 px^3	222 ± 66,5 px^3
2,2 ± 0,2 µm	1,0 ± 0,1 µm	1,9 ± 0,5 µm^3	1,6 ± 0,5 µm^3

Les dimensions estimées sont de 11 ± 1,2 px (soit 2,2 ± 0,2 µm) de longueur et de 4,9 ± 0,6 px (soit 1,0 ± 0,1 µm) de diamètre. La quantité moyenne de px^3 contenue dans une bactérie, d'après l'estimation de *regionprops3* est de 254 ± 71,1 px^3 (soit un volume de 1,9 ± 0,5 µm^3). En considérant la bactérie comme un cylindre, la valeur de volume obtenue est de 222 ± 66,5 px^3 (soit 1,6 ± 0,5 µm^3), ce qui est du même ordre de grandeur. Les dimensions obtenues sont en accord avec ce qui a été auparavant avancé dans de précédents travaux (Francius *et al.* 2011; Oh *et al.* 2007; Présent *et al.* 2017).

Ainsi, il a été décidé, à partir de la valeur moyenne du volume cylindrique de 222 px^3, d'appliquer un filtre pour supprimer les domaines inférieurs à 100 px^3, soit *ca.* la moitié de ce volume estimé, afin de conserver les éventuelles bactéries lysées. En effet, il est considéré que pour des domaines inférieurs à cette valeur seuil, ce ne sont pas les bactéries qui sont étudiées (**Figure 56 B**). Il peut s'agir d'artefacts, de débris, d'agrégats de protéines ou polysaccharides, ou de bactéries lysées (O'Toole *et al.* 2000; Yerly *et al.* 2007). Il est primordial d'appliquer un filtre lors de l'étude de ses volumes afin de conserver uniquement les pixels d'intérêt. Ainsi, seuls les volumes qu'on estime correspondre à des bactéries sont conservés (**Figure 56 C**).

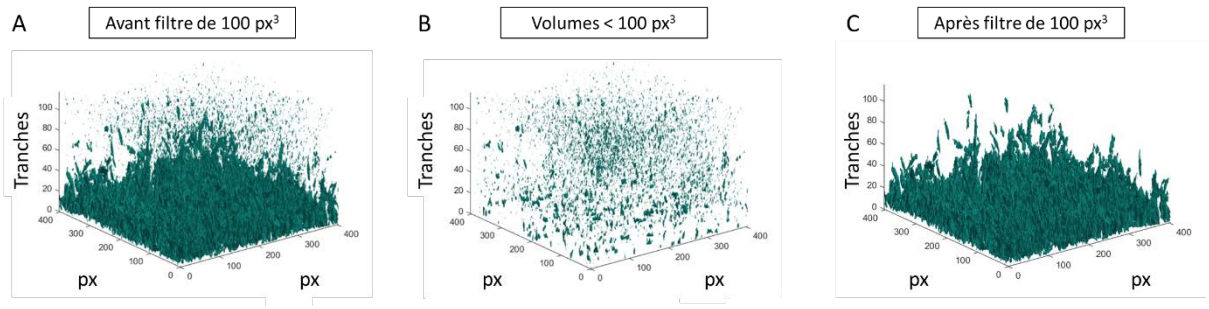


Figure 56 : Représentations 3D de l'ensemble des volumes de pixels d'un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Avant application du filtre à 100 px^3, B : Compris dans le filtre à 100 px^3 et C : Après application du filtre à 100 px^3.

La quantité de pixels occupés restant après application du filtre démontre que plus de 90 % du biofilm est conservé (**Tableau 8**). Ce filtre permet l'élimination d'artefacts tout en conservant la quasi-totalité du biofilm. Il est à noter que, le diamètre d'une NP (130 ± 10 nm ***cf.*** **Chapitre 2 § I.2**) étant inférieur aux dimensions d'un pixel (194 nm × 194 nm), conserver les NPs isolées aurait signifié de n'appliquer aucun filtre sur les volumes, et ainsi de conserver les domaines des biofilms correspondant aux artefacts. Il a donc été décidé que les NPs isolées seraient filtrées. D'un point de vue général, un artefact correspond à un élément qui n'est pas naturellement présent dans l'échantillon observé et qui résulte de la procédure de préparation de l'échantillon (*e.g.* séchage, mauvais placement de l'échantillon), d'investigation ou de traitement de l'image. Dans cette étude, des pixels isolés traduisant la présence de poussières ou des débris à la surface de l'échantillon peuvent apparaître. L'image peut également être bruitée pouvant amener à l'apparition de motifs non existant sur l'échantillon (*e.g.* franges). L'ajout ou la suppression de certains pixels de l'image peuvent se produire du fait d'une acquisition perturbée du signal ou du processus de traitement de l'image.

Ainsi les NPs seront détectées directement si elles sont liées entre elles ou avec des bactéries (*e.g.* sous forme de grappes ou d'agrégats) (Choi *et al.* 2010; Mathelié-Guinlet *et al.* 2017; Pagnout *et al.* 2012; Planchon *et al.* 2013). La résolution de l'holotomographe ne permet pas de visualiser directement les NPs isolées ou leurs effets sur les parois bactériennes (*e.g.* impacts, abrasion) (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018; Stoimenov *et al.* 2002).

Tableau 8 : Pixels occupés demeurant après application du filtre à 100 px^3.

Type de biofilm	Pixels occupés restant après filtre à 100 px^3 (%)
YeeJ (E2551)	96
YeeJ (E2551) + NPs $SiNH_2$	98
YeeJ (E2551) + NPs SiCOOH	94

10. Etude des volumes

Les volumes sont représentés en 3D et selon des projections selon (X, Z) et (X, Y) pour visualiser leur répartition au sein des biofilms (**Figure 57 A, B, C**) (Remarque : Les nuances de vert sont dues à un rendu artificiel de la représentation 3D de Matlab et ne reflètent aucune information quantitative). La base a été définie en coupant le biofilm à Z = 20 pixels soit 20 × 194 nm (résolution verticale du pixel) ≈ 4 µm de hauteur, ce qui équivaut à 20 tranches, et correspondrait à environ 4 bactéries superposées parfaitement horizontalement par rapport au substrat, ou plus d'une bactérie disposée verticalement (**Figure 57 D, E, F**). Ces 20 premières tranches ont été désignées comme « base » à partir de la répartition des domaines observés sur un biofilm de YeeJ (E2551) seules. L'observation de cette base, ainsi que le dénombrement de pixels occupés en son sein, constitue une approche pour constater l'évolution de la structure du biofilm au contact du substrat en verre, en fonction de la présence ou non de NPs.

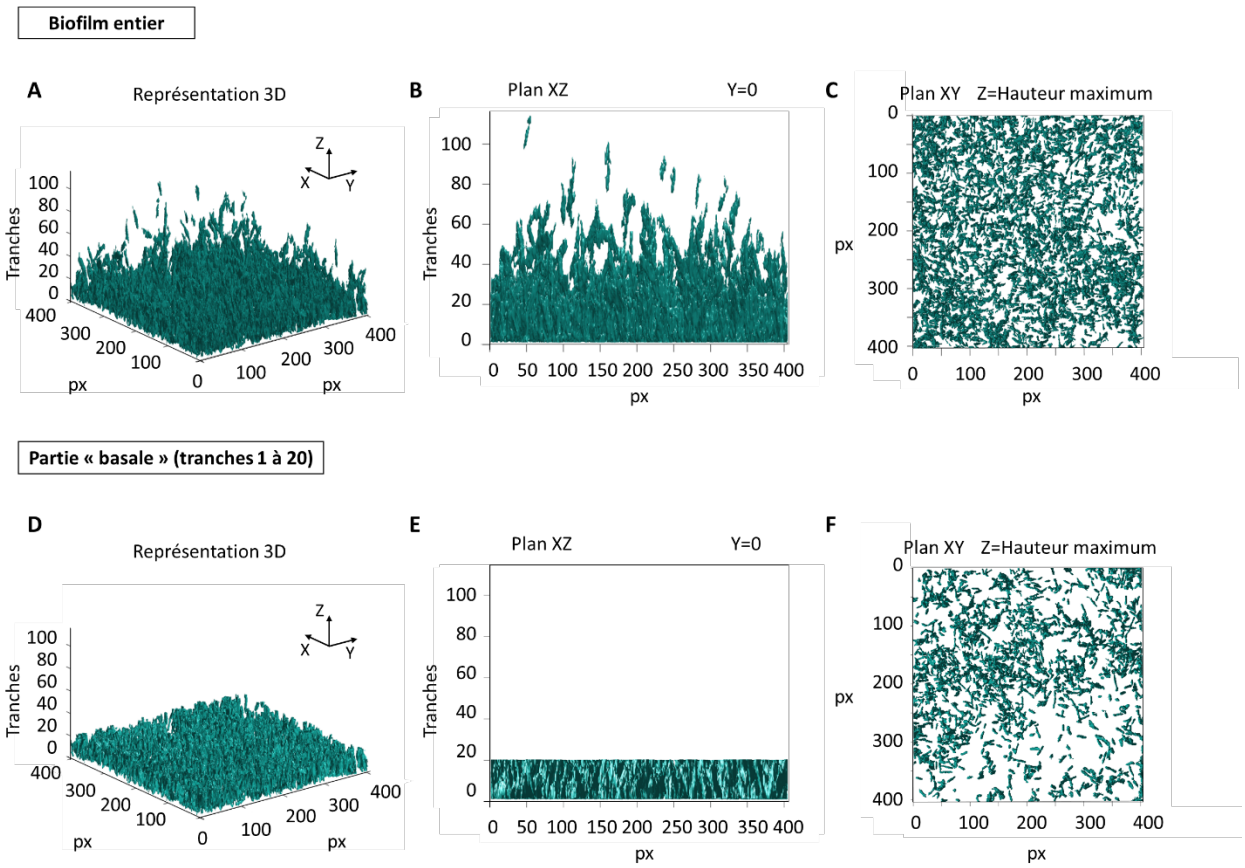


Figure 57 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551), dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Projection selon le plan (X, Z) tel que Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Projection selon le plan (X, Y) tel que Z = position maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ».

En outre, un exemple de distribution des volumes de pixels connectés, autrement appelés domaines, normalisés par le nombre de domaines cumulés, est présenté en **Figure 58**. La majorité des domaines ont un volume compris entre 100 et 2000 px^3. Il existe quelques domaines isolés de volume compris entre 2000 et 10^5 px^3. Cependant, ceux-ci étant présents chacun de manière unique, et par souci de lisibilité, ils ne sont pas représentés dans les graphiques suivants. La largeur d'une classe est de 50 px^3. La fréquence d'une de ces classes correspond au rapport entre le nombre de domaines, dont le volume (px^3) est compris dans cette classe, et le nombre total de domaines, ramené à un pourcentage.

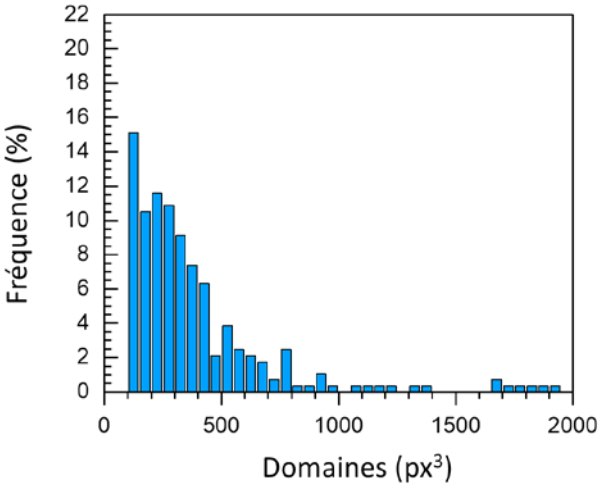


Figure 58 : Exemple de distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) entre 100 et 2000 px^3.

11. Etude par tranche bactérienne

Il a été décidé que le diamètre d'une bactérie soit estimé à 5 px, ce qui équivaut à 0,97 µm, afin de découper en « tranches » le biofilm selon un nombre entier de pixels en hauteur Z. Un rapport entre le nombre de pixels occupés par tranche et le nombre total de pixels occupés dans le biofilm, ramené à un pourcentage, est présenté sous forme d'histogramme (**Figure 59**). Cette disposition permet une visualisation de la répartition des bactéries au sein du biofilm.

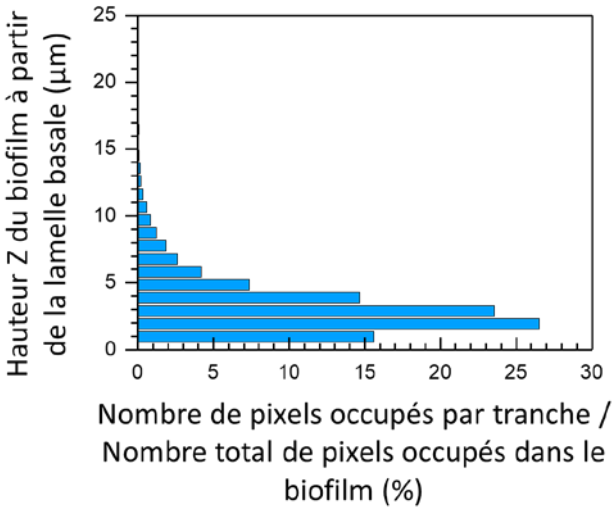


Figure 59 : Exemple d'histogramme représentant l'évolution du nombre de pixels occupés selon la hauteur Z dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. La hauteur Z est en µm.

III. Effet des NPs sur la structuration des biofilms

Dans cette partie est présentée l'influence des NPs sur la structure des biofilms selon les critères d'épaisseur, d'occupation, de densité, et du taux de couverture au sein des biofilms considérés. La répartition des volumes et des pixels occupés au sein du biofilm est ensuite analysée. Trois types de biofilms sont soumis à cette étude :

- Un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules ;
- Un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) mises en culture en présence de NPs $SiNH_2$ à une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$;
- Un biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) mises en culture en présence de NPs SiCOOH à une concentration de 0,4 $g.L^{-1}$.

Tous les biofilms ont connu une période de croissance de 24 h, en conditions statiques, conformément au protocole détaillé dans le **chapitre 2 § V.3 et 4**.

Par ailleurs, la **Figure 60** rassemble les principales figures discutées dans cette partie **III** et sert de support pour l'étude comparative en **§ III.4**. De même, des tableaux récapitulatifs des valeurs d'épaisseur moyenne, d'occupation moyenne et de θ (**Tableau 12**), ainsi que les valeurs des différentes contributions d'épaisseur et d'occupations des distributions (**Tableau 13**), sont disponibles dans cette même étude comparative.

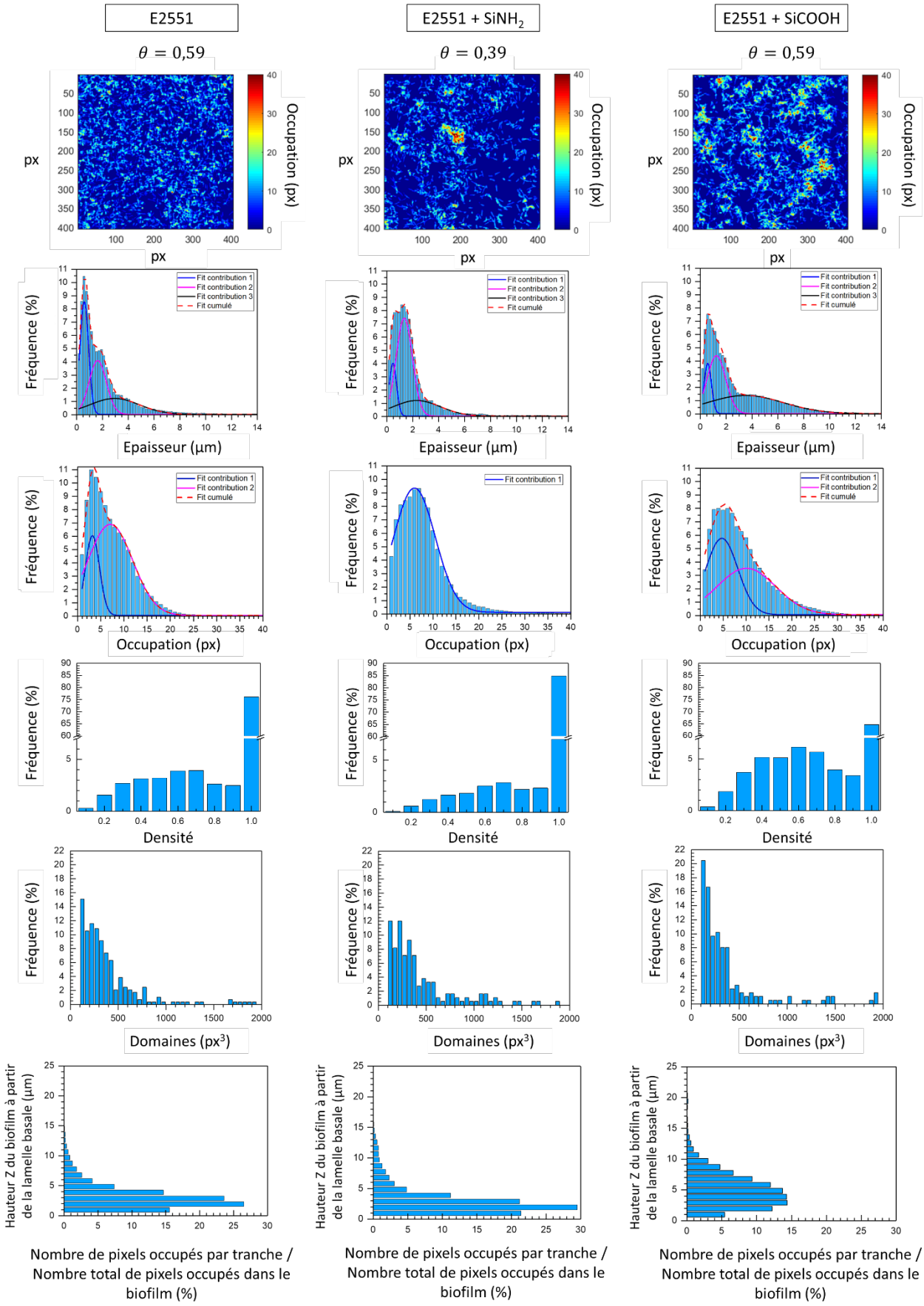


Figure 60 : Comparaison des images 2D d'occupation, des distributions d'épaisseur (µm), de l'occupation (px), des domaines (px³), et du décompte du nombre de pixels occupés par groupe de 5 px de hauteur, pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH.

1. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules

1.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité

Les MIP YZ et XZ (**Figure 61 B, C**) montrent que la lamelle basale est située aux environs de la tranche 90. La détermination automatique du plan Z (**§ II.3**) nous renseigne sur sa position avec précision. Toutes les tranches inférieures à celle-ci ne sont pas considérées dans la suite de l'étude. En première approche, la MIP XY (**Figure 61 A**) témoigne de l'homogénéité du biofilm, en termes de répartition sur le plan (X, Y). Ensuite, les représentations 2D de l'épaisseur et de l'occupation du biofilm (**Figure 61 D, E**) montrent que la répartition des bactéries semble homogène. En effet, des groupes de bactéries (entre 20 et 40 px²), et des zones vides de taille similaire sont réparties en proportion équivalente sur le substrat. De plus, peu d'agrégats sont observés.

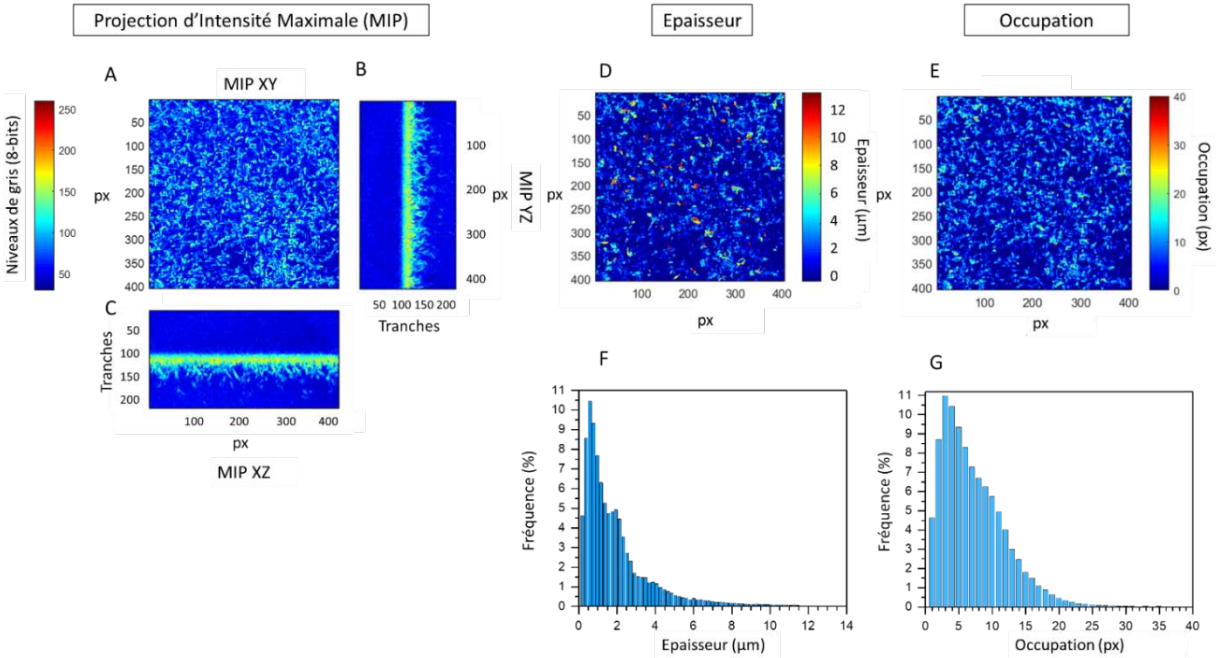


Figure 61 : Représentations des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de l'épaisseur (nm) en fonction de la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%).

Sur l'histogramme d'épaisseur du biofilm (**Figure 61 F**), 3 contributions sont repérables. Des modèles gaussiens sont appliqués à chacune de ces contributions, afin de déterminer la valeur x_c du centre de la contribution et l'écart σ_c à ce centre (**Figure 62**).

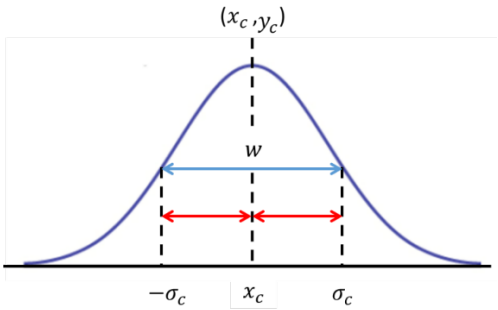


Figure 62 : Paramètres du modèle gaussien appliqué sur les distributions d'épaisseurs et d'occupation. x_c est le centre de la courbe gaussienne, w correspond à la largeur de la courbe et $\sigma_c = w/2$.

Le diamètre attendu d'une bactérie est de 1,0 µm, c'est-à-dire *ca.* 5 px. D'après la **Figure 63** et le **Tableau 9**, une première contribution est centrée sur 0,59 ± 0,33 µm. La somme des fréquences de cette contribution est de 57 %. Une seconde contribution, contenant 26 % des fréquences totales, est centrée sur 1,63 ± 0,67 µm.

Ces deux contributions peuvent correspondre à des bactéries dans différents états. En effet, l'épaisseur de 0,59 ± 0,33 µm correspond potentiellement au diamètre d'une bactérie, même si elle est inférieure à la valeur attendue (1,0 µm). L'écart entre ces deux valeurs pourrait avoir une origine biologique. Selon l'état de la bactérie (entière, en division, lysée (Taheri-Araghi *et al.* 2015)), la longueur et le diamètre d'une bactérie peuvent être amenés à diminuer ou à augmenter. Cependant, cet écart de valeur pourrait provenir du processus de traitement de l'image. En effet, lors de la détermination d'un plan de coupure, en-dessous duquel les tranches selon Z sont supprimées, il est possible que des pixels constituant des bactéries positionnées contre la lamelle basale soient eux aussi supprimés. Ainsi, au lieu que ce plan intervienne à Z=0, il interviendrait à Z=2. Sachant qu'une tranche équivaut à 0,2 µm, à Z=2 cela signifierait que 0,4 µm selon Z seraient supprimés. Si cette épaisseur de 0,4 µm est ajoutée à l'épaisseur obtenue de 0,59 µm, la valeur attendue de 1,0 µm de diamètre de bactérie est atteinte.

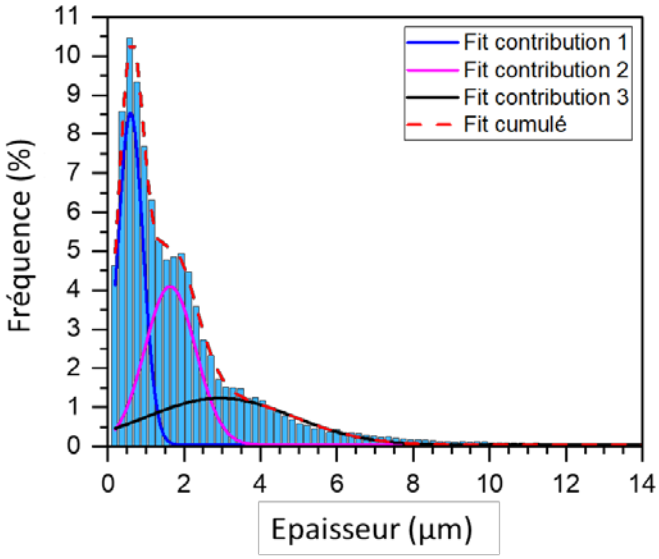


Figure 63 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens.

La deuxième contribution d'épaisseur peut correspondre à des bactéries qui ne sont pas toutes déposées horizontalement par rapport au substrat. En effet, une bactérie mesure 2,2 µm de long, ce qui équivaut à 11 px. Il est donc possible que les bactéries soient disposées en diagonale, ce qui pourrait expliquer la valeur centrale de 1,63 ± 0,67 µm. Cette contribution peut également résulter de la superposition de 2 bactéries horizontalement. En outre, si, de même que pour la première contribution, on estime que le plan de coupure n'est pas situé à la base exacte du biofilm, l'addition de 0,4 µm à la valeur de la deuxième contribution d'épaisseur (1,63 µm) permettrait d'atteindre une épaisseur de 2,0 µm, soit celle de deux bactéries superposées horizontalement.

Les deux premières contributions contiennent 83 % des fréquences totales, soit la quasi-totalité des épaisseurs mesurées. La troisième contribution, contenant 17 % des fréquences, est centrée sur 2,94 ± 1,91 µm. A partir de 7,50 µm, on peut supposer qu'il s'agit soit de bactéries isolées, de débris ou d'artefacts, soit de la partie supérieure du biofilm en construction qui constituent 0,3 % de la distribution. Le biofilm est donc potentiellement constitué principalement d'une monocouche voire d'une deuxième et d'une troisième couche.

Tableau 9 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs x_c et σ_c relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en Figure 63 et des 2 contributions de la distribution d'occupation en Figure 64, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules.

Contribution	Somme des fréquences des contributions relatives à l'épaisseur (%)	Epaisseur $x_c \pm \sigma_c$ (µm)	Somme des fréquences des contributions relatives à l'occupation (%)	Occupation $x_c \pm \sigma_c$ (px)
1	57,0	0,59 ± 0,33	52,3	3,2 ± 1,5
2	26,0	1,63 ± 0,67	40,4	7,1 ± 4,8
3	17,0	2,94 ± 1,91		

Concernant l'histogramme d'occupation du biofilm YeeJ (E2551) (**Figure 64**), deux contributions sont observables. La première est centrée sur 3,2 ± 1,5 px, et la deuxième sur 7,1 ± 4,8 px (**Tableau 9**). Ainsi 57 % des occupations sont comprises entre 1 et 7 px. Les valeurs d'occupation de 1 à 2 px peuvent correspondre à des débris ou des artefacts. Entre 2 et 3 px, il peut s'agir d'une bactérie disposée horizontalement, le diamètre attendu étant de 5 px. Ainsi, elle pourrait soit avoir été tronquée par la procédure de traitement de l'image, soit avoir été altérée.

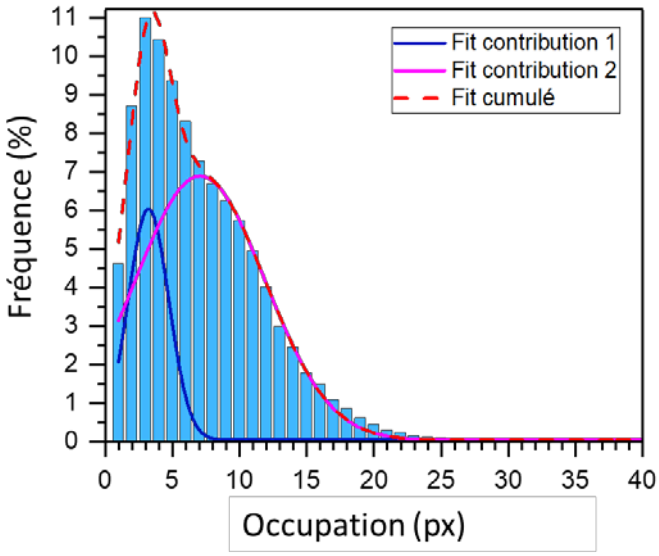


Figure 64 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) dont les 2 contributions sont approximées par des modèles gaussiens.

Enfin, la fréquence de distribution de l'occupation devient inférieure à 0,5 % à partir de 20 px. Cela montre que la détermination de l'occupation permet de compléter les informations fournies par le calcul d'épaisseur. Il est donc possible d'affirmer que le biofilm occupe jusqu'à 20 px dans la direction

Z, ce qui équivaut à 4 bactéries disposées horizontalement ou 1 à 2 verticalement. Au-delà de 20 px, des valeurs d'occupation existent mais représentent 1 % de la distribution totale.

La **Figure 65** présente la répartition de la densité en image 2D (**Figure 65 A**) et l'histogramme correspondant (**Figure 65 B**). Dans cet histogramme, 75 % de la distribution est à une densité de 1. Cela signifie que $T_{occ} = E_p$. Le biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules est donc rempli de manière relativement homogène. L'épaisseur moyenne du biofilm est de 2 µm, ce qui équivaut à la superposition dans la direction Z de 2 bactéries horizontales, ou d'une bactérie verticale. L'occupation moyenne étant de 7 px, cela tend à confirmer l'hypothèse d'une monocouche et de la constitution d'une deuxième couche de bactéries. Enfin, la détermination de θ donne comme information que 59 % de la surface observée est occupée par le biofilm.

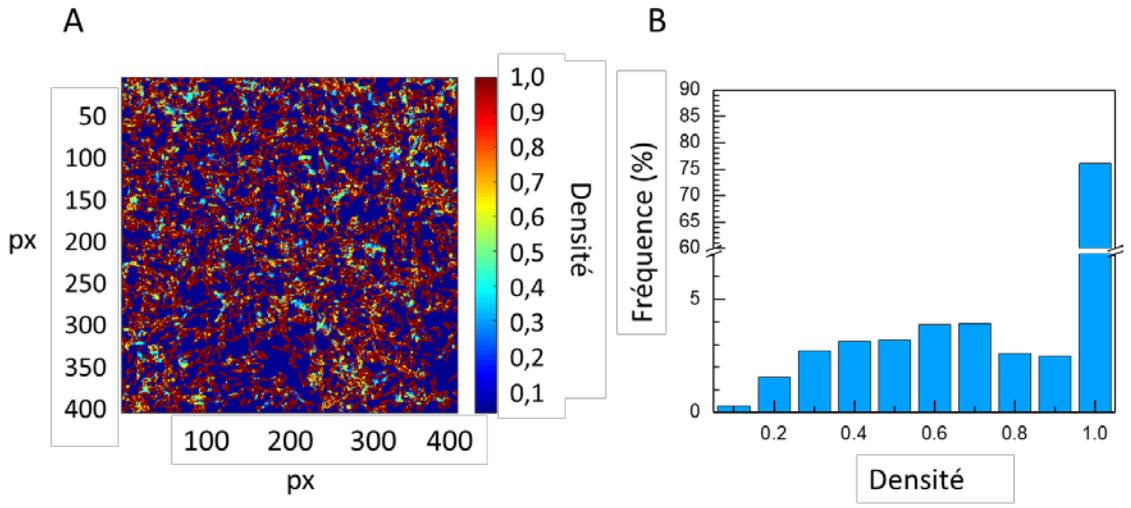


Figure 65 : Représentations de la densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). A : Image 2D projetée selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables.

1.2 Etude des domaines

En **Figure 66** est représenté le biofilm en 3D (**Figure 66 A**), selon le plan XZ avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y=0 (**Figure 66 B**) et selon le plan XY avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum (**Figure 66 C**). Elle permet de rendre compte de la répartition des volumes au sein du biofilm d'un point de vue purement qualitatif. De manière similaire aux **Figure 61 D et E**, la répartition des bactéries semble homogène. La représentation en XZ (**Figure 66 B**) conforte la décision de traiter plus particulièrement de la partie du biofilm comprise entre les tranches 1 et 20 que nous désignerons comme « basale ». En effet, la dispersion des bactéries dans la zone au-delà de la tranche 20 est plus hétérogène, la quantité de domaine étant moindre et la

répartition de ces domaines étant irrégulière par rapport à ce qui est observé dans la partie « basale » (**Figure 66 D et E**). Il est à noter que dans la **Figure 66 F,** représentant la répartition des domaines situés en-deçà de Z = 20 selon le plan XY, le biofilm semble plus hétérogène. Une zone entre les pixels 200 et 400 selon X et entre les pixels 200 et 400 selon Y semble contenir une quantité moindre de bactéries par rapport à ce qui est observé sur le biofilm entier en **Figure 66 C**.

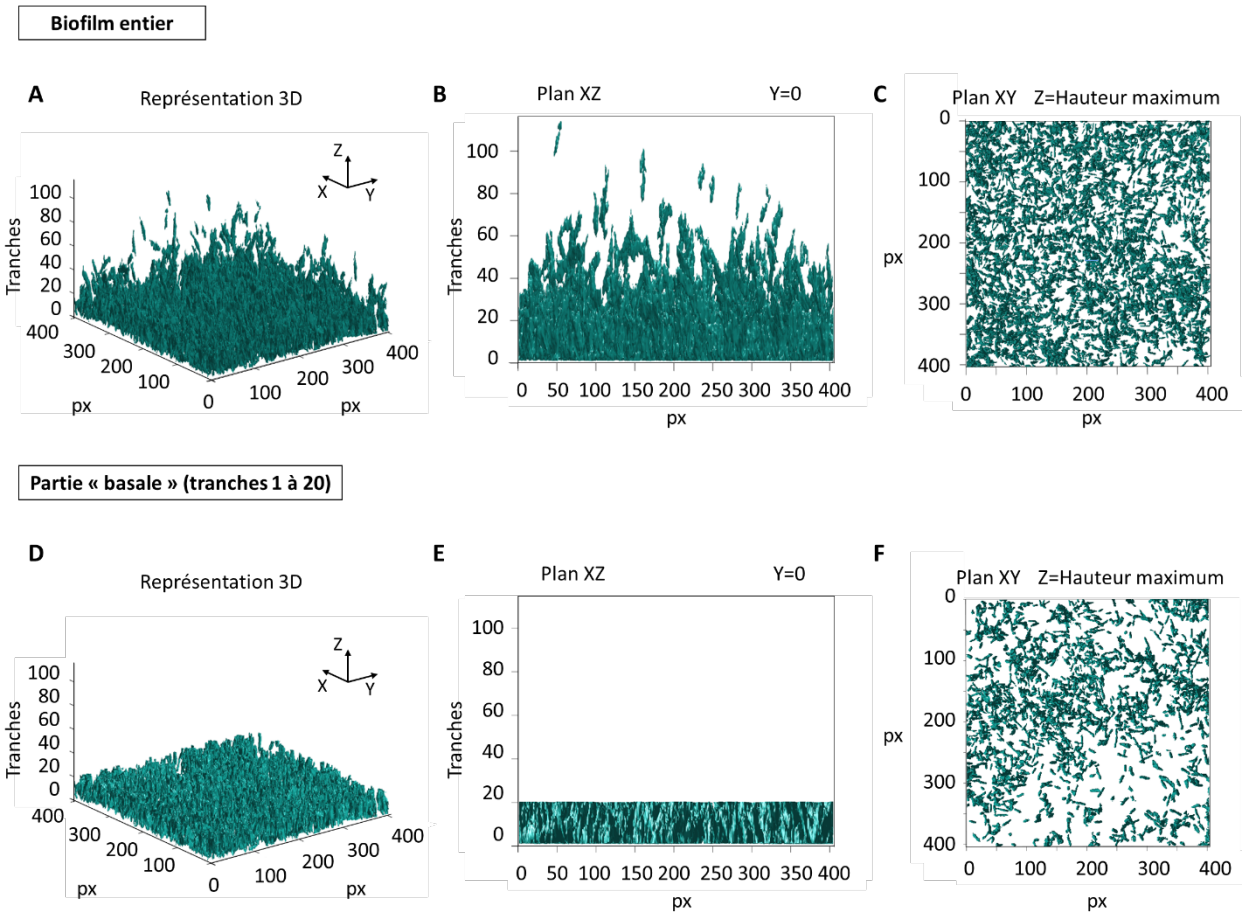


Figure 66 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551), dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ».

La **Figure 67 A** présente la distribution des domaines mesurant entre 100 et 2000 px^3, au sein du biofilm entier, en fonction de leur fréquence. Les domaines compris entre 100 et 150 px^3 représentent 15 % de la distribution. Ces volumes sont inférieurs au volume estimé d'une bactérie seule, de même que précédemment l'épaisseur était inférieure au diamètre attendu d'une bactérie. Pour rappel, le volume estimé d'une bactérie cylindrique est de 222 px^3.

Plusieurs explications sont à considérer pour trouver l'origine de cet écart. Tout d'abord, les bactéries pourraient être lysées, amenant leur volume à diminuer. Cependant, cette différence pourrait également, et plus probablement, provenir du fait que seules 4 bactéries isolées ont été considérées pour estimer un volume moyen. Une étude statistique du volume d'un nombre plus important de bactéries aurait pu fournir un volume moyen de l'ordre de 100 à 150 px^3. Enfin, comme expliqué précédemment, il est possible que la position du plan de coupure en Z ait pour effet une suppression d'une partie du volume des bactéries situées sur le substrat en verre de la dish.

Une deuxième contribution est centrée sur 250 px^3 et constitue 58 % des domaines du biofilm. Elle correspond davantage au volume estimé des bactéries, le nombre de pixels contenus dans une bactérie, selon *regionprops3* étant estimé à 254 ± 71,1 px^3. La contribution suivante est centrée sur 550 px^3 et constitue 11 % des domaines du biofilm. Le volume de ces domaines peut correspondre ainsi à celui de deux bactéries liées ou en division. Enfin, il est à noter que le volume maximum estimé est de $1{,}92 \times 10^5$ px^3 et se loge dans la partie « basale » du biofilm.

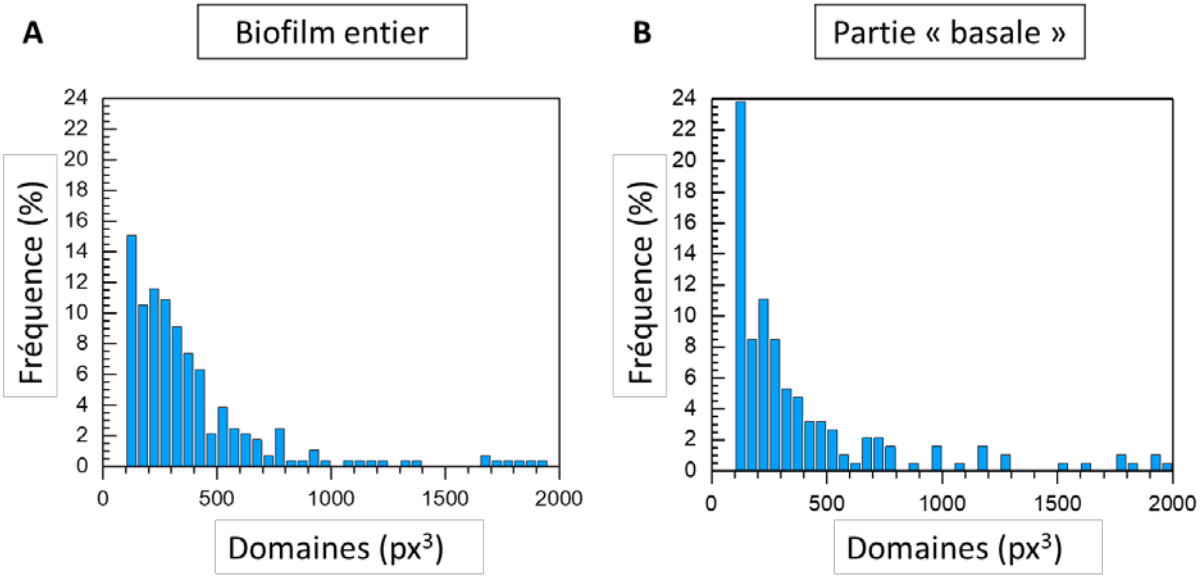


Figure 67 : Distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale ».

Sur la **Figure 67 B** sont représentés les domaines compris dans les tranches 1 à 20, entre 100 et 2000 px^3. La largeur d'une classe est de 50 px^3. La fréquence d'une de ces classes correspond au rapport entre le nombre de domaines, dont le volume (px^3) est compris dans cette classe, et le nombre total de domaines compris dans la partie « basale » du biofilm, ramené à un pourcentage.

Il est à savoir que 80,3 % des pixels occupés sont situés dans cette partie « basale » du biofilm. Cependant, des différences sont notables avec la distribution visible en **Figure 67 A** concernant le

biofilm entier. En effet, la contribution des volumes compris entre 100 et 150 px^3 est plus élevée dans la partie « basale » (24 % pour 15 % dans le biofilm entier). Cela confirme la position de ces plus faibles volumes au sein du biofilm qui seraient proches du substrat en verre. De plus, la proportion de domaines compris entre 300 et 500 px^3 est nettement plus faible (16 % dans la partie « basale » pour 24 % dans le biofilm entier) et la contribution à 550 px^3 n'est pas complète. Les domaines manquant à ces deux contributions sont donc situés dans la partie « supérieure » du biofilm, et peuvent correspondre à des bactéries dans une des premières phases de constitution de celui-ci, à savoir l'attachement initial ou l'adhésion réversible (Monroe 2007).

Une représentation d'une zone du biofilm de dimension 50 × 50 px en (X, Y) est disponible en **Figure 68**. La partie A représente la partie « basale » de Z = 1 à 20 px et la partie B les tranches de Z = 21 à 80 px de la partie « supérieure ». Sur la **Figure 68 A**, quelques bactéries sont disposées horizontalement à la surface du substrat, et la majorité d'entre elles sont verticales. Un des domaines de cette partie du biofilm correspond à celui attendu d'une bactérie isolée (260 px^3), cependant les autres domaines voient leurs volumes compris entre 900 et 4400 px^3 au lieu des 254 ± 71,1 px^3 attendus. La connexion des bactéries proches, induite par les EPS de la matrice du biofilm (Flemming and Wingender 2010; Formosa-Dague *et al.* 2016), pourrait expliquer que les domaines atteignent ces valeurs élevées. Ils rassembleraient ainsi plusieurs bactéries. Les domaines de la partie supérieure du biofilm (**Figure 68 B**) correspondent davantage à ceux de bactéries isolées. Cela pourrait signifier que ces bactéries sont dans la phase d'adhésion réversible ou d'attachement initial, et qu'elles ne sont par conséquent pas intégrées dans la matrice du biofilm (Flemming *et al.* 2016; Kim *et al.* 2016b; Liu *et al.* 2015).

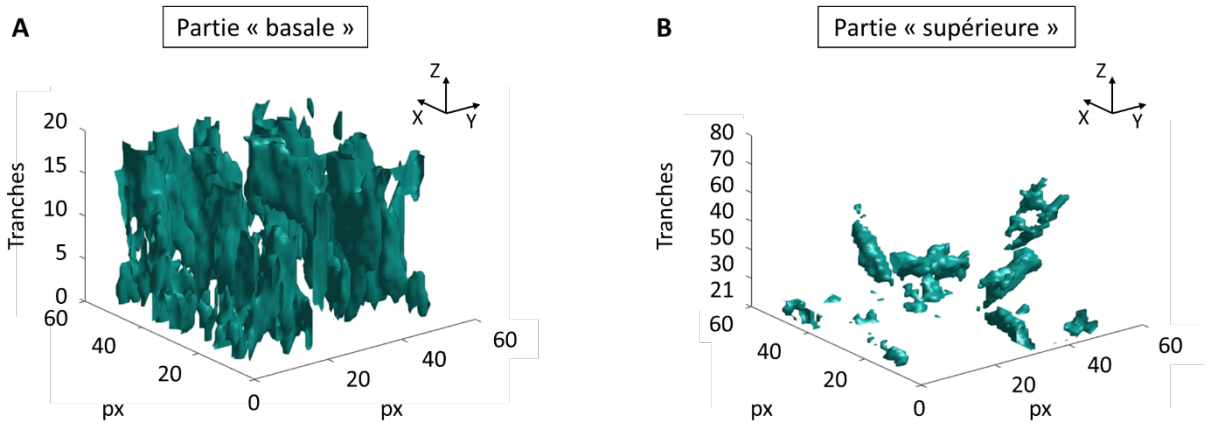


Figure 68 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50 × 50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px.

Dans la **Figure 69**, la proportion de pixels occupés par rapport au nombre total de pixels occupés est calculée dans chaque tronçon de 5 px (soit le diamètre estimé d'une bactérie). Ainsi, 80 % des pixels occupés du biofilm se concentrent dans les 20 premières tranches, et donc dans les 4 premiers groupes correspondant au diamètre estimé d'une bactérie, ce qui signifie que le biofilm peut atteindre 4 µm d'épaisseur. Cependant, la quantité de pixels occupés est moins importante dans le premier groupe (de Z = 1 à 5 px, soit *ca.* 1 µm) que dans le deuxième groupe (de Z = 6 à 10 px soit *ca.* 2 µm). Cela confirme que les bactéries présentes dans la première couche sont moins nombreuses que dans les couches suivantes. Cela pourrait s'expliquer par une réorganisation de la matrice du biofilm dont le but est d'optimiser les échanges entre bactéries, tout en les protégeant du stress extérieur et de la dessiccation (Costerton *et al.* 1995; Flemming and Wingender 2010; Flemming *et al.* 2016; O'Toole *et al.* 2000; Whitfield *et al.* 2015). Ce stress peut être d'ordre mécanique, avec pour conséquence possible une augmentation de la production d'EPS (Fonseca and Sousa 2007; Shaw *et al.* 2004).), mais il peut également provenir d'un changement des conditions du milieu (O'Toole *et al.* 2000), ou d'une agression par des éléments extérieurs *e.g.* des antibiotiques (Costerton *et al.* 1999; Flemming *et al.* 2016; Fonseca and Sousa 2007), des composants métalliques (Ordax *et al.* 2010), ou des NPs (Choi *et al.* 2010). Par ailleurs, ces éléments extérieurs peuvent causer des dommages du fait de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) entrainant ce que l'on appelle un stress oxydatif (Radzig *et al.* 2013). Dans notre cas, ce stress est généré entre autres par la présence de NPs, mais également par le fait que le milieu de culture est un milieu minimum, limitant l'accès des bactéries à des réserves nutritives importantes.

De plus, certains biofilms puisent dans les bactéries lysées les ressources nutritives nécessaires à la survie de la communauté (López-León *et al.* 2005), ce qui pourrait expliquer la diminution du nombre de bactéries dans la couche la plus proche du substrat. Cela confirmerait que les bactéries présentes dans les couches 3 et 4 n'en sont encore qu'à l'étape d'attachement initial ou d'adhésion réversible (Monroe 2007) et sont les plus proches de l'état planctonique. Et dans cet état, les bactéries ne seraient pas « incluses » dans la matrice du biofilm, et elles ne recevraient donc aucun signal leur indiquant une éventuelle réorganisation (Flemming *et al.* 2016; Kim *et al.* 2016b; Liu *et al.* 2015).

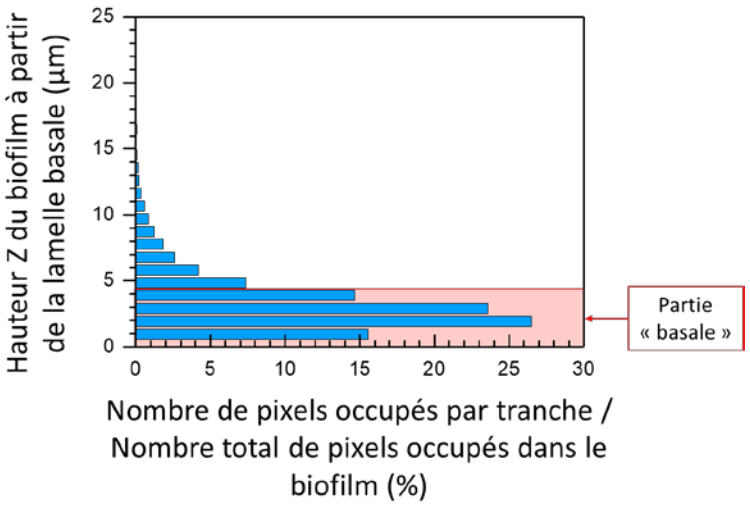


Figure 69 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551). Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm.

2. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence d'une concentration de 0,4 g.L^{-1} de NPs $SiNH_2$

2.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité

Les conditions de culture sont les mêmes que précédemment. Cependant, des NPs de $SiNH_2$ ont été mélangées aux bactéries avant la mise en culture, pour atteindre une concentration finale de NPs de 0,4 g.L^{-1}, ce qui équivaut à une répartition de $1,7 \times 10^4$ NPs par bactérie.

D'après les MIP YZ et XZ (**Figure 70 B, C**), la lamelle supérieure n'est pas visible, signifiant que le biofilm n'est pas compressé par celle-ci. En première approche, la MIP XY (**Figure 70 A**) semble témoigner d'une répartition plus hétérogène des objets observés, par rapport au biofilm constitué de bactéries seules. Cette hétérogénéité est visible sur les images 2D d'épaisseur et d'occupation (**Figure 70 D, E**) car des agrégats de 20 à 40 px² (soit de 16 à 64 µm²) sont observables, ainsi que des espaces vides de 30 à 70 px² (soit de 36 à 196 µm²). L'agrégat le plus important est repérable sous la forme d'une cheminée de 70 px dans sa plus grande longueur, au centre du biofilm (indiquée par un cercle blanc sur les **Figure 70 B, C et D**).

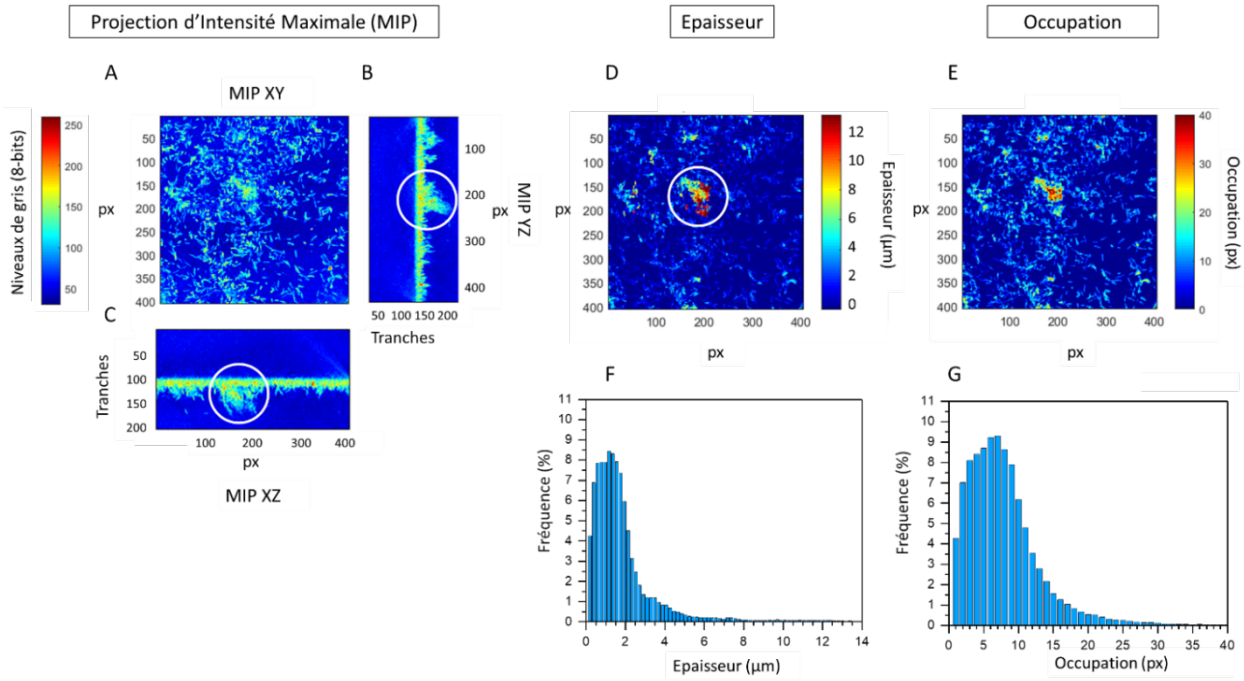


Figure 70 : Représentations des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). Les cercles blancs correspondent à une cheminée irrégulière de 80 px de hauteur située entre les pixels 100-200 en X et Y. D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de l'épaisseur (nm) en fonction de la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%).

Sur l'histogramme d'épaisseur (**Figure 70 F**), il est difficile de distinguer les différentes contributions. L'application de modèles gaussiens (**Figure 71**, **Tableau 10**) montre que la première contribution est centrée sur 0,47 ± 0,28 µm et la deuxième contribution sur 1,35 ± 0,62 µm. Ces valeurs, inférieures à celles rencontrées pour le biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules (*i.e.* 0,59 ± 0,33 µm pour la première contribution et 1,63 ± 0,67 µm pour la deuxième) pourraient s'expliquer par une modification ou une altération de la paroi bactérienne par les NPs $SiNH_2$. De plus, la somme des fréquences de la première contribution s'élève à 35 %, au lieu des 57 % rencontrés pour le biofilm précédent. La deuxième contribution constitue 53 % de la distribution. L'importance de ces deux contributions s'est donc inversée. Cela pourrait signifier que la deuxième contribution est constituée de complexes NPs/bactéries/constituants du biofilm (*e.g.* EPS, protéine, acides nucléiques) (Choi *et al.* 2010; Flemming and Wingender 2010; Stewart and Franklin 2008). Par ailleurs, la troisième contribution reste dans le même ordre de grandeur (13 %) et est centrée sur 2,31 µm, ce qui est encore une fois inférieur à ce qui a été obtenu pour le biofilm de YeeJ (E2551) seules (*i.e.* 2,94 ± 1,91 µm). Cela tendrait à confirmer l'hypothèse d'altération de l'intégrité de la membrane bactérienne par des NPs (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018, 2017). Les épaisseurs calculées au-delà des limites de la troisième contribution représentent 0,3 % de la distribution.

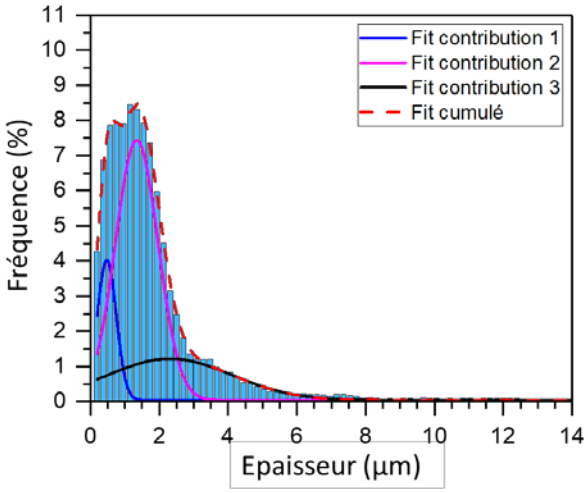


Figure 71 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens.

Tableau 10 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs x_c et σ_c relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en Figure 71 et de la contribution de la distribution d'occupation en Figure 72, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$.

Contribution	Somme des fréquences des contributions relatives à l'épaisseur (%)	Epaisseur $x_c \pm \sigma_c$ (µm)	Somme des fréquences des contributions relatives à l'occupation (%)	Occupation $x_c \pm \sigma_c$ (px)
1	34,8	0,47 ± 0,28	100,0	6,0 ± 4,5
2	52,5	1,35 ± 0,62		
3	12,7	2,31 ± 1,81		

Concernant l'histogramme de l'occupation (**Figure 70 G**), un mode unique est discernable. L'application d'un modèle gaussien (**Figure 72** et **Tableau 10**) montre que la distribution est centrée sur 6 ± 4,5 px. En réalité, la deuxième contribution n'est pas visible sur la distribution, car les 2 pics attendus à 3 et 7 px ne sont plus résolus. Cela signifie que la deuxième contribution est beaucoup plus importante que la première, rendant le premier pic impossible à distinguer. Ainsi la proportion d'objets entrainant une occupation centrée autour de 7 px a augmenté. Ces objets sont potentiellement des agrégats ou des complexes NPs/bactéries/EPS. Par ailleurs, le biofilm s'étend jusqu'à 30 px dans la direction Z, ce qui traduit la présence de la cheminée.

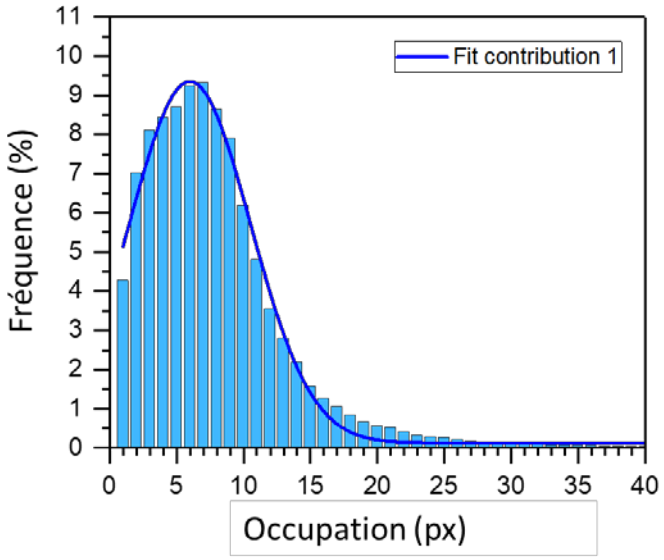


Figure 72 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ dont la contribution est approximée par un modèle gaussien.

Sur la figure présentant la densité en image 2D (**Figure 73 A**), l'hétérogénéité du biofilm est davantage visible par la présence conjointe de creux, d'agrégats et de la cheminée. Dans l'histogramme de densité associé (**Figure 73 B**), 85 % de la distribution est à une densité de 1. Cela confirme les conclusions apportées par l'étude des distributions d'épaisseurs et de l'occupation. Par ailleurs, les calculs de l'épaisseur moyenne et de l'occupation moyenne montrent que le biofilm n'est, en moyenne, pas plus épais que celui constitué de bactéries YeeJ (E2551) (1,9 µm pour le biofilm comportant des NPs $SiNH_2$ et 2,0 µm pour le biofilm constitué de bactéries seules). L'occupation moyenne de 8 px est du même ordre que celle du biofilm constitué de bactéries seules (7 px), ce qui tend à traduire, concernant l'aspect « moyen » du biofilm, l'hypothèse d'une monocouche et de la constitution d'une deuxième couche de bactéries. Cependant, la valeur de θ de 0,39 démontre que le biofilm recouvre une surface moins importante que le biofilm constitué de bactéries seules (θ=0,59). Le biofilm comporte donc des zones très épaisses, les agrégats et la cheminée, et des zones qui sont au contraire vides.

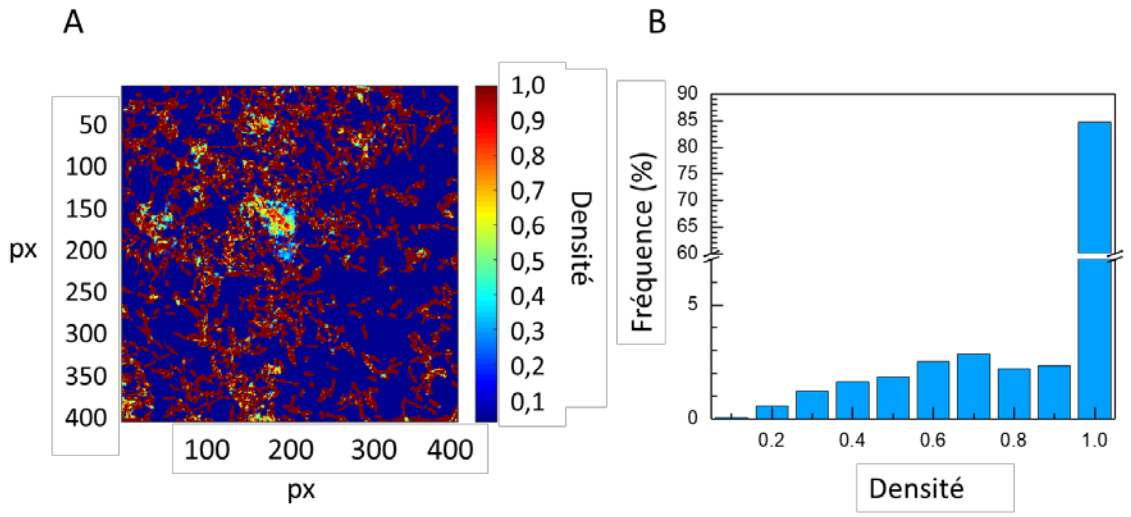


Figure 73 : Représentations de densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A : Image 2D projetée selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables.

2.2 Etude des domaines

Les représentations 3D (**Figure 74 A, D**) permettent de rendre compte de la répartition des domaines dans le biofilm et dans sa base. Une irrégularité de cette répartition selon Z est visible en **Figure 74 A.** La représentation en 2D du biofilm selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y=0 (**Figure 74 B**) montre clairement l'existence de 2 cheminées principales entre 60 et 80 px de hauteur (soit respectivement 12 et 16 µm) et 50 à 60 px de largeur estimée (soit respectivement 10 et 12 µm). Plusieurs autres petites cheminées d'une hauteur comprise entre 30 et

40 px, (soit entre 6,0 et 8,0 µm) et d'une dizaine de pixels de large (soit 2 µm) sont visibles. Comme pour le biofilm de bactéries seules, la partie du biofilm considérée comme « basale » est estimée à 20 px de hauteur (**Figure 74 D, E, F**). La **Figure 74 F** montre que la base de la cheminée principale commence dans la partie « basale » du biofilm. Les images 2D (**Figure 74 C, F**), selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum, confirment son hétérogénéité par la présence de zones vides de 50 à 100 px et de zones, au contraire, comprenant davantage de domaines. La zone d'émergence de la cheminée principale indiquée par les cercles rouges en fait partie.

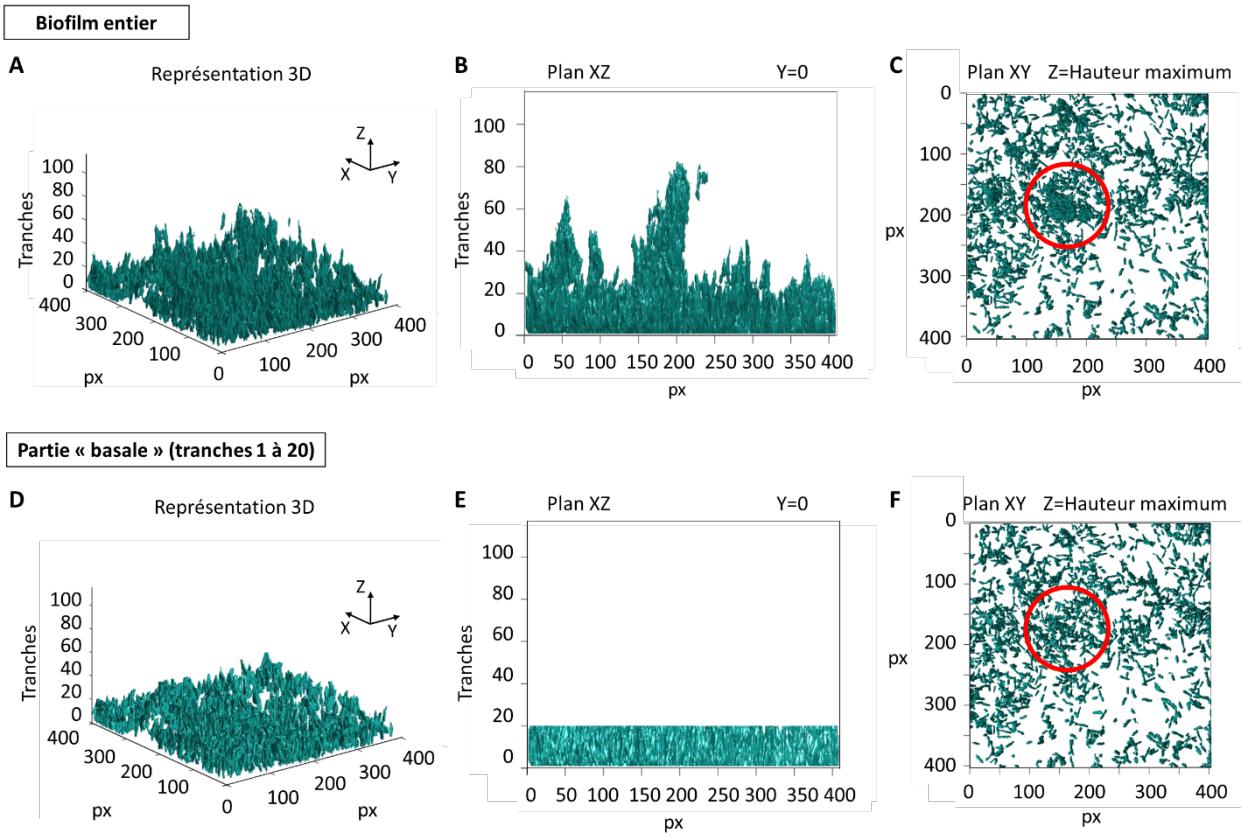


Figure 74 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$, dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ». Un cercle rouge de 140 px de diamètre indique la localisation de la cheminée principale.

Par ailleurs, le volume estimé de la cheminée principale, considérée en tant que cylindre, est de $2{,}3 \times 10^5$ px^3, soit $1{,}6 \times 10^3$ μm^3, ce qui correspond probablement au volume du domaine maximum

obtenu dans ce biofilm ($1,72 \times 10^5$ px^3). Ce domaine maximum constitue 35 % des pixels occupés. La **Figure 75**, montre le domaine correspondant à la cheminée. Cette cheminée fait partie de la structure « basale » et se construit depuis la première tranche du biofilm. A titre de comparaison, le domaine maximum du biofilm de bactéries seules est de $1,92 \times 10^5$ px^3, ce qui est dans le même ordre de grandeur que celui de ce biofilm généré en présence de NPs $SiNH_2$.

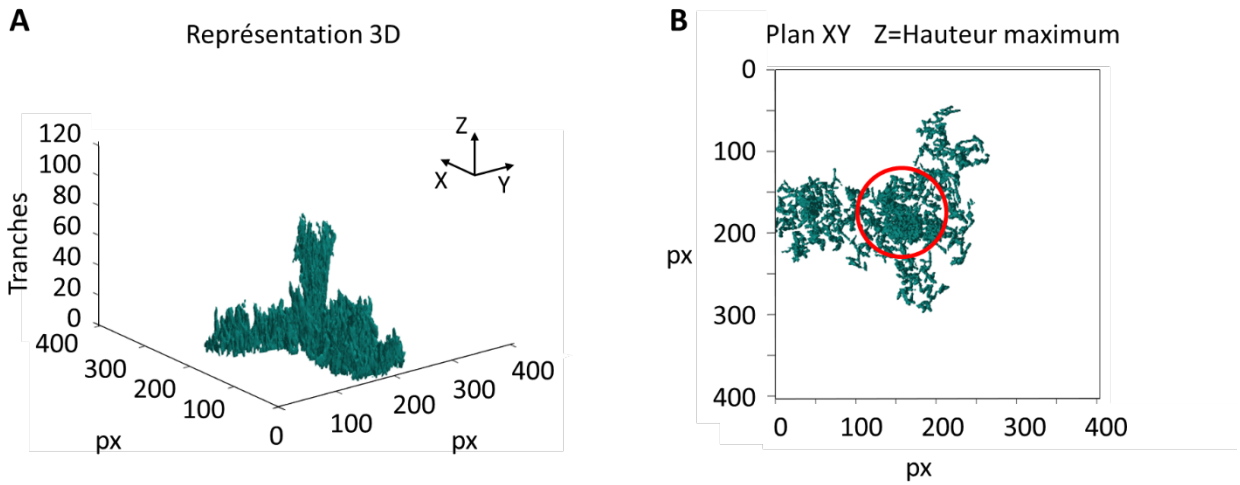


Figure 75 : Domaine maximum du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs. A : Représentation 3D, B : Représentation selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum, un cercle rouge de 110 px de diamètre indique la localisation de la cheminée principale.

La distribution des domaines entre 100 et 2000 px^3, dans l'ensemble du biofilm, est présentée en **Figure 76 A**. Le premier groupe, correspondant à nouveau à un volume compris entre 100 et 150 px^3, présente une fréquence de 12 %. Comme précédemment, ces valeurs de volume sont inférieures au volume estimé d'une bactérie seule. Le mode de la contribution suivante, dont le centre est positionné entre 200 à 250 px^3, soit un volume assimilable au volume expérimental estimé des bactéries de 222 px^3, atteint également une fréquence d'apparition de 12 %. Cette contribution constitue 44 % des domaines du biofilm et représente, avec les domaines du premier groupe (*i.e.* ayant un volume compris entre 100 et 150 px^3), la première couche bactérienne du biofilm. La contribution suivante est centrée sur 500 px^3 et représente 15 % de la distribution. Comme pour le biofilm de bactéries seules, cette contribution correspondrait à la mise en place de la deuxième couche bactérienne. Deux autres contributions notables semblent se discerner à 700 et 1100 px^3 (représentant respectivement 6 et 8 % de la distribution des domaines). Elles résultent probablement de l'agrégation de NPs ou de la constitution de complexes NPs/bactéries, et témoignent de l'existence des cheminées. Sur la **Figure 76 B** sont représentés les domaines compris dans les tranches 1 à 20, entre 100 et 2000 px^3. La distribution est similaire à celle du biofilm entier (**Figure 76 A**) et il est à noter que 83,2 % des pixels

occupés sont situés dans cette partie « basale » du biofilm. Pour rappel, les domaines d'un volume supérieur à 2000 px^3 ne figurent pas sur ces distributions. Cela signifierait donc que la partie « supérieure » du biofilm n'est en fait constituée que de domaines de volume supérieurs à 2000 px^3, traduisant la présence d'agrégats et de cheminées.

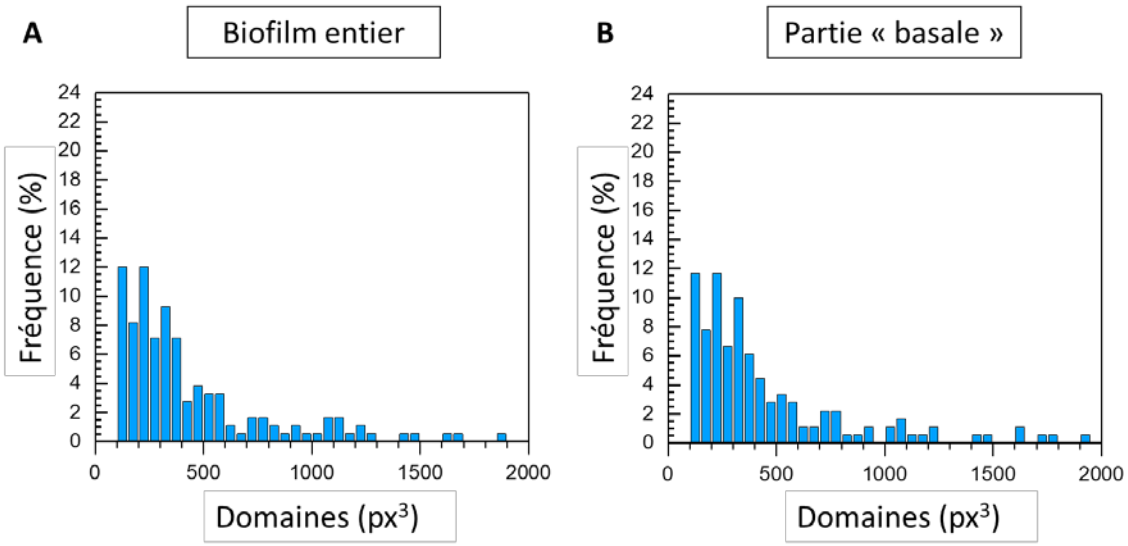


Figure 76 : Distribution des domaines du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$ normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale ».

Cela est confirmé par la **Figure 77** qui représente une zone du biofilm de dimension 50 × 50 px en (X, Y). En effet, la **Figure 77 B** détaille les domaines présents entre les tranches de Z = 21 à 80 px, c'est-à-dire dans la partie « supérieure » du biofilm, et montre un agrégat constituant une partie de la cheminée principale centrale. L'échantillon de la « base » du biofilm (**Figure 77 A**), de manière similaire au biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules, montre quelques bactéries déposées horizontalement. Néanmoins la majorité d'entre elles sont verticales. De plus, les zones vides sont moins étendues, signifiant que les domaines sont davantage rapprochés les uns des autres. Ainsi, les domaines de la zone en **Figure 77 B** sont en majorité compris entre 450 et $1{,}2 \times 10^4$ px^3.

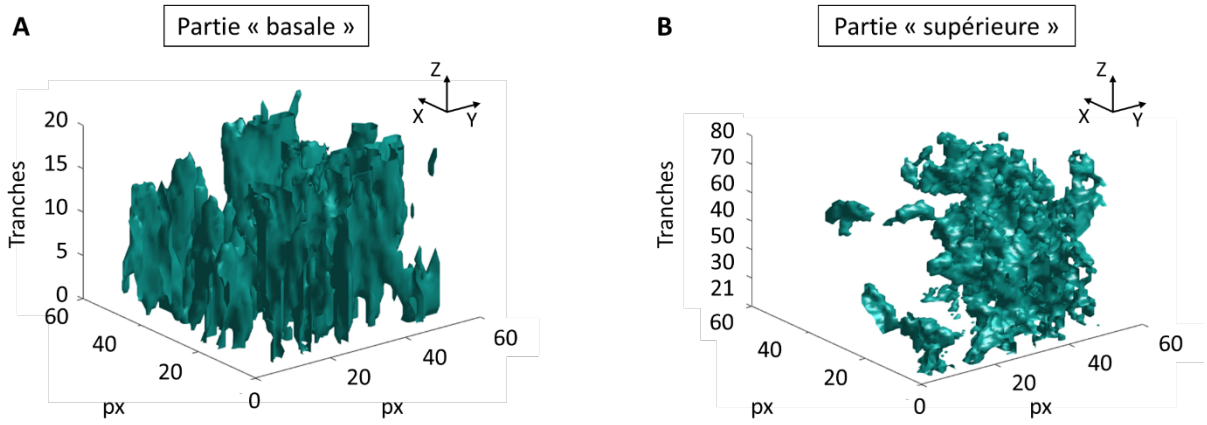


Figure 77 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50 × 50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px.

Enfin, sur la **Figure 78,** la forme de la distribution du nombre de pixels occupés par tranche bactérienne est analogue à celle du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules (**Figure 69**).

La répartition des bactéries YeeJ (E2551) au sein du biofilm sans ou en présence de NPs $SiNH_2$ est donc comparable en termes de proportion de pixels, par couches définies par groupes de Z = 5 px. Cependant, la présence de cheminées implique une hétérogénéité se matérialisant par une variation de la hauteur Z selon les différentes zones du biofilm. Cette hétérogénéité marquée en hauteur n'est pas retrouvée dans le biofilm constitué de bactéries seules.

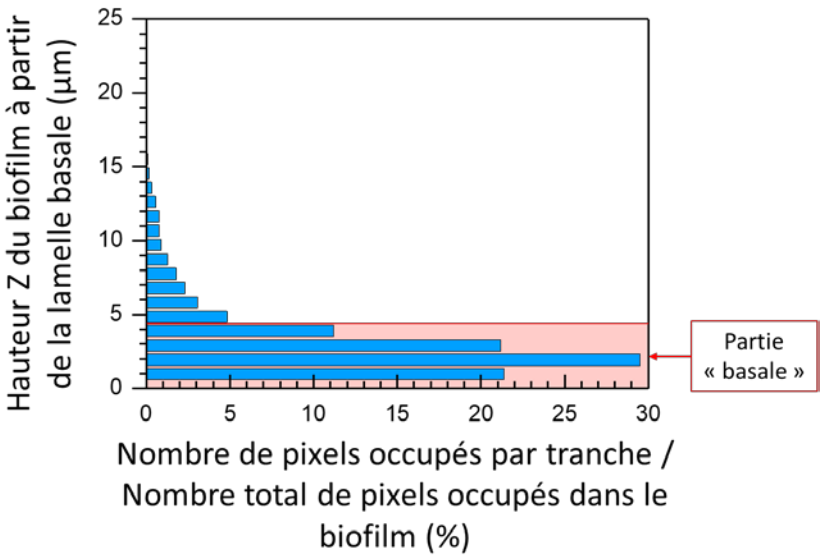


Figure 78 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs $SiNH_2$. Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm.

3. Biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) en présence de 0,4 g.L^{-1} de NPs SiCOOH

3.1 Etude de l'épaisseur, de l'occupation et de la densité

Les conditions de cultures sont identiques à celles des deux autres biofilms, cependant les NPs sont des NPs SiCOOH. La concentration en NPs est à nouveau de 0,4 g.L^{-1}, ce qui équivaut à une répartition de 1,7 $\times$ 10^4 NPs par bactérie.

Sur les MIP YZ et XZ (**Figure 79 B, C**) ne témoigne de la formation d'aucune structure de type cheminée. La MIP XY (**Figure 79 A**) semble montrer en première approximation une hétérogénéité du biofilm. Plusieurs agrégats de 50 px², soit 100 µm², sont visibles sur les représentations 2D de l'épaisseur et de l'occupation du biofilm (**Figure 79 D**, indiqués par des cercles blancs, et **Figure 79 E**). Ils peuvent correspondre à des agrégats de NPs ou à des complexes NPs/bactéries. A l'inverse, plusieurs zones vides, également de 50 px², s'intercalent entre les agrégats.

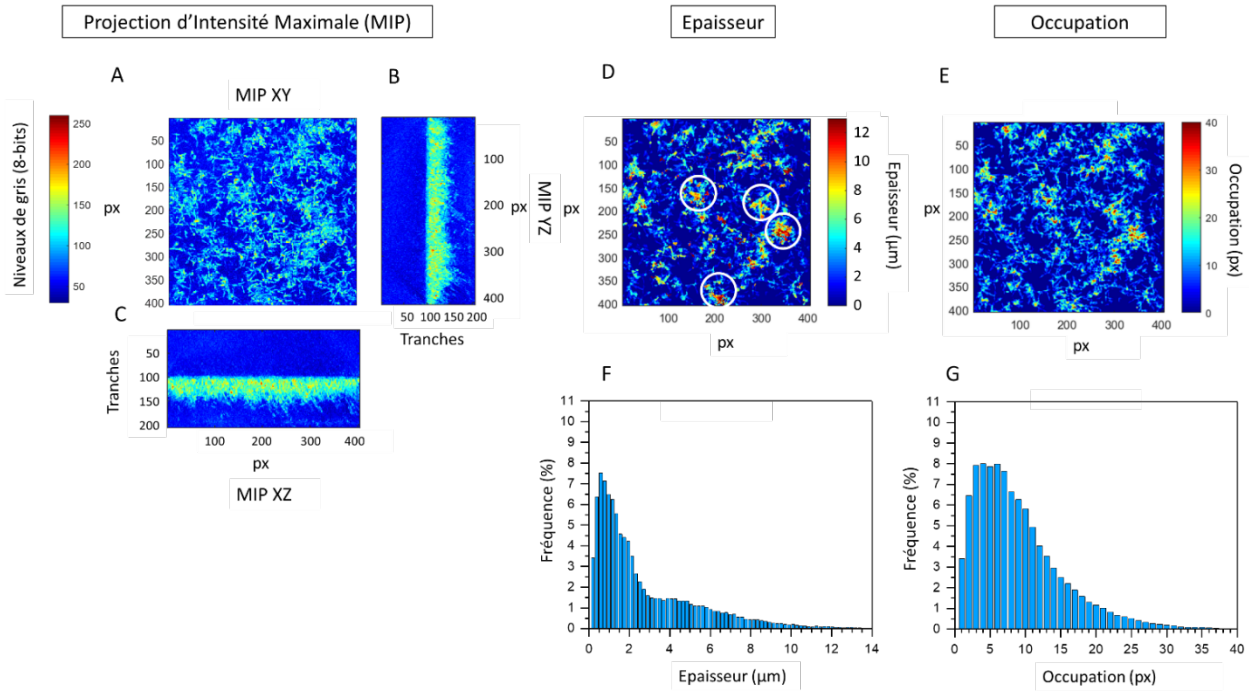


Figure 79 : Représentation des MIP, épaisseur et occupation du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A, B, C : MIP selon les plans (X, Y), (Y, Z) et (X, Z). D : Représentation 2D de l'épaisseur. E : Représentation 2D de l'occupation. F : Distribution de l'épaisseur (nm) en fonction de la fréquence (%). G : Distribution de l'occupation (px) en fonction de la fréquence (%). Les cercles blancs correspondent à des agrégats de 50 px².

Sur la distribution d'épaisseurs (**Figure 79 F**), trois composantes sont visibles, comme pour le biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules. Des modèles gaussiens sont appliqués à chacune d'entre elles afin de déterminer les centres des contributions (**Figure 80** et **Tableau 11**). La première composante est

centrée sur 0,57 ± 0,28 µm, et 47 % des fréquences de la distribution d'épaisseurs la constitue. Il s'agit, comme précédemment expliqué, de la première couche de bactéries. La deuxième contribution se situe à 1,24 ± 0,72 µm, ce qui est inférieur à l'épaisseur des deuxièmes composantes des biofilms constitués de bactéries seules et en présence de $SiNH_2$ (respectivement 1,63 ± 0,67 µm et 1,35 ± 0,62 µm). Seuls 69 % de la distribution sont compris dans les deux premières composantes de la **Figure 80**. La troisième contribution est centrée sur 3,48 ± 2,95 µm ce qui rend compte de valeurs d'épaisseur plus élevées en comparaison avec la distribution d'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) seules (contribution centrée sur 2,94 ± 1,91 µm) et en présence de $SiNH_2$ (contribution centrée sur 2,31 ± 1,81 µm). Cela traduit le fait que le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH est plus épais que le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules ou en présence de NPs $SiNH_2$, alors qu'en comparaison, sa deuxième couche bactérienne est moins épaisse.

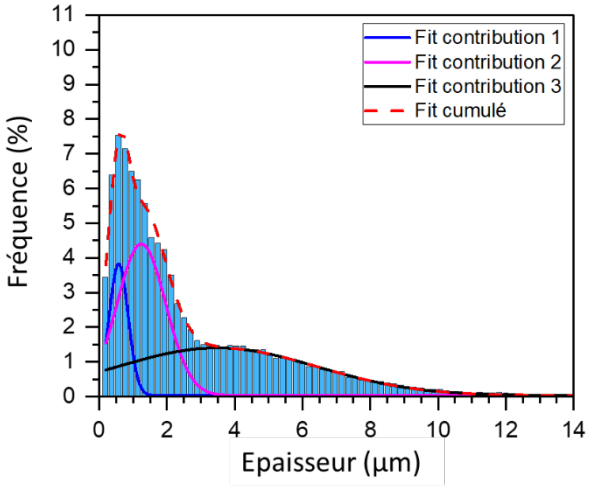


Figure 80 : Histogramme de l'épaisseur du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH dont les 3 contributions sont approximées par des modèles gaussiens.

Tableau 11 : Somme des fréquences de chaque contribution et valeurs x_c et σ_c relatives aux centres des 3 contributions de la distribution d'épaisseur en Figure 80 et des 2 contributions de la distribution d'occupation en Figure 81, concernant le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH.

Contribution	Somme des fréquences des contributions relatives à l'épaisseur (%)	Epaisseur $x_c \pm \sigma_c$ (µm)	Somme des fréquences des contributions relatives à l'occupation (%)	Occupation $x_c \pm \sigma_c$ (px)
1	47,3	0,57 ± 0,28	77,0	4,7 ± 3,5
2	22,0	1,24 ± 0,72	23,0	10 ± 6,5
3	31,1	3,48 ± 2,95		

La distribution de l'occupation (**Figure 79 G**) s'étend au-delà de 40 px, alors que pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules et en présence de $SiNH_2$ il s'agissait respectivement de 25 et 30 px. L'application d'un modèle gaussien sur les deux contributions (**Figure 81** et **Tableau 11**) montre que la première est située à 4,7 ± 3,5 px, et la deuxième, confondue avec la première, à 10 ± 6,5 px. Il existe donc 2 couches bactériennes au minimum. En outre, l'écart ± 6,5 px traduit l'existence d'une troisième couche, l'occupation d'une bactérie disposée horizontalement étant estimée à 5 px.

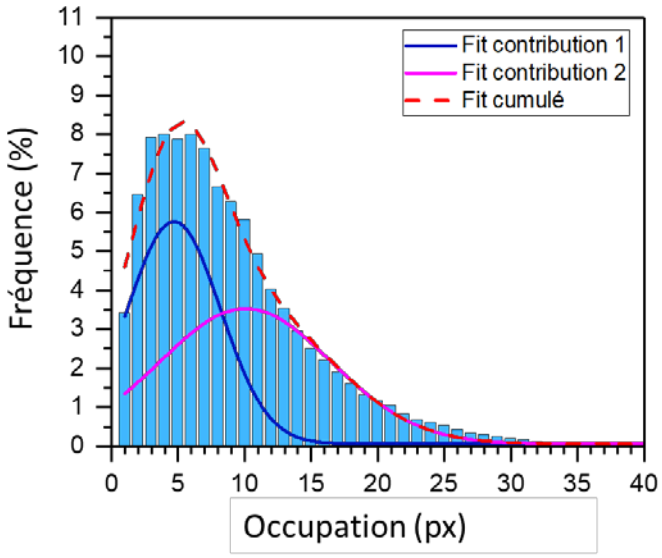


Figure 81 : Histogramme de l'occupation du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH dont les 2 contributions sont approximées par des modèles gaussiens.

L'hétérogénéité du biofilm, matérialisée par les zones de vides intercalées avec des agrégats, est davantage visible sur la représentation 2D de la densité (**Figure 82 A**). Sur l'histogramme de densité

associé (**Figure 82 B**), seuls 65 % de la distribution correspondent à une densité de 1 telle que $T_{occ} = E_p$. Il s'agit du biofilm le plus épais des 3 étudiés, mais le moins dense. L'épaisseur moyenne de 2,8 µm traduit un biofilm dont l'épaisseur peut être égale à 3 bactéries superposées horizontalement ou 1 verticalement. L'occupation moyenne de 9,0 px est plus importante que pour les autres biofilms, montrant que le biofilm est plus étendu en hauteur. Ces valeurs d'épaisseur et d'occupation plus élevées que pour les précédents biofilms pourraient provenir de la répartition selon la direction Z de pixels isolés correspondant à des NPs SiCOOH en suspension. Enfin, malgré l'hétérogénéité du biofilm et la présence d'agrégats de 50 px^2, la valeur de taux de couverture obtenue est de 0,59, comme pour le biofilm constitué de bactéries seules.

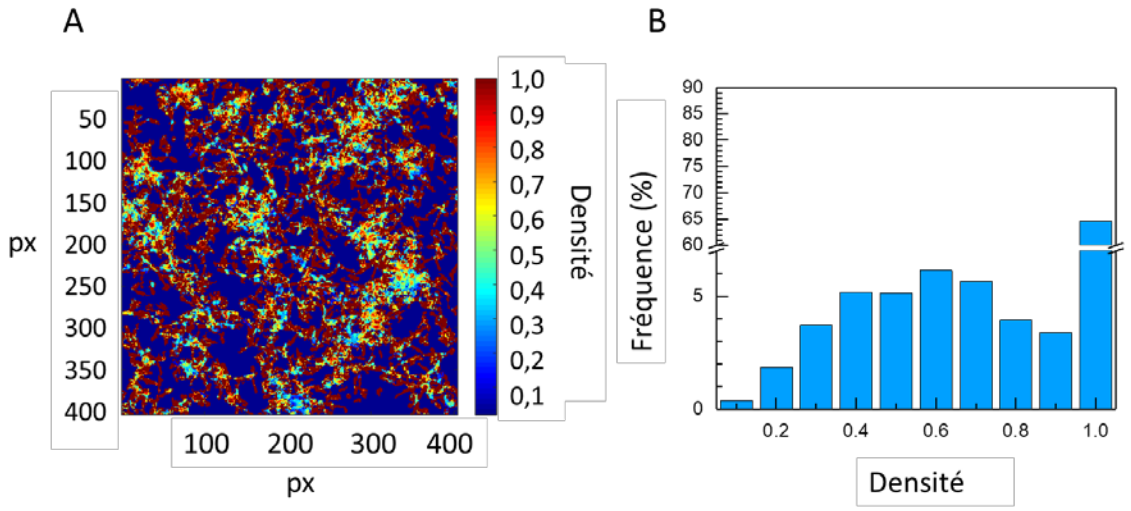


Figure 82 : Représentations de la densité du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A : Image 2D selon le plan (X, Y), B : Histogramme de la densité du biofilm. L'échelle en Y est interrompue à 7 % pour reprendre à 60 % afin que les données comprises entre 0,1 et 0,9 soient observables.

3.2 Etude des domaines

La représentation 3D du biofilm (**Figure 83 A**) ainsi que sa représentation en 2D selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum (**Figure 83 C**) confirment la présence d'agrégats, et ainsi le caractère hétérogène du biofilm. La partie « basale » semble s'étendre de Z = 0 à 40 px de hauteur (**Figure 83 B**). Dans le but de comparer la même quantité de pixels dans les parties « basales » de chaque biofilm (***cf.* § III.4**), la « base » est tout de même considérée ici comme étant comprise entre Z = 0 et Z = 20 px (**Figure 83 D, E** et **F**).

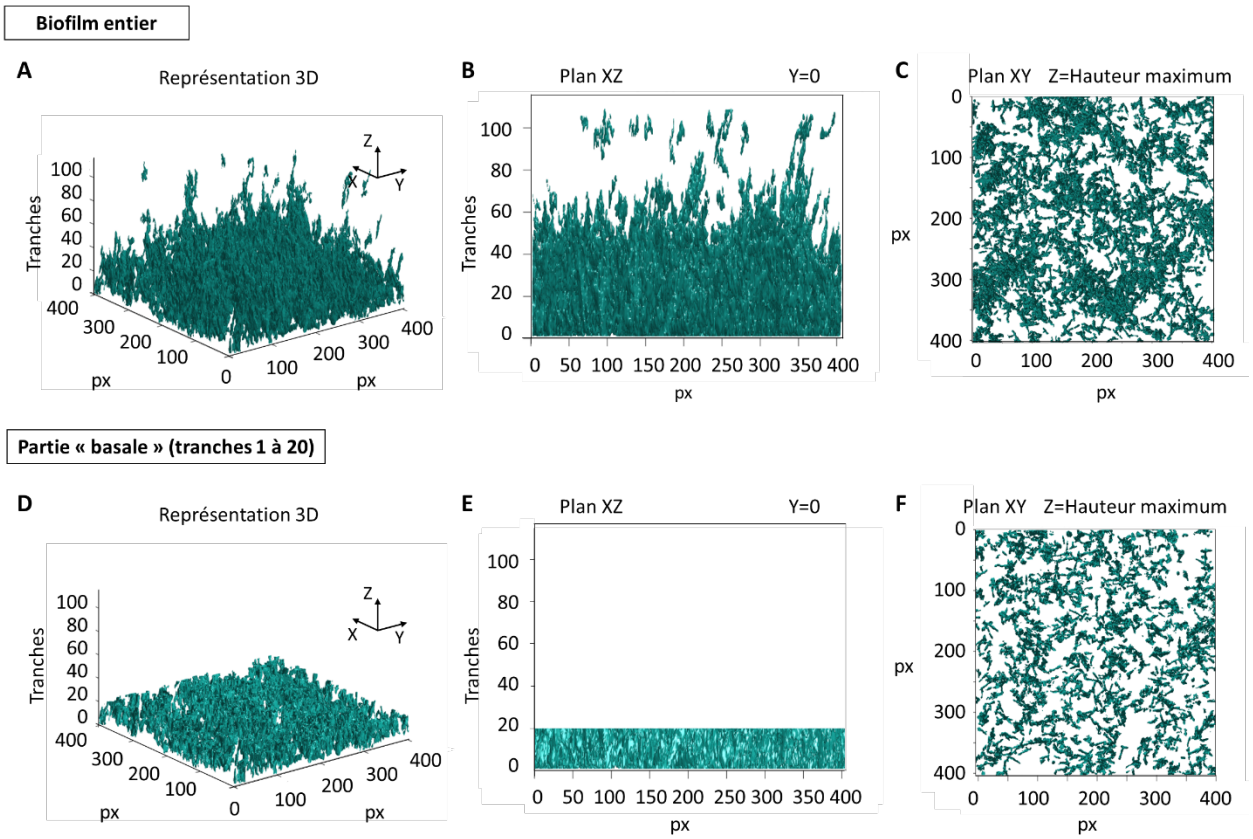


Figure 83 : Représentations du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH, dans son intégralité et en considérant uniquement la partie désignée comme « basale ». A, D : Images 3D du biofilm entier, et de sa partie « basale », B, E : Vue selon le plan (X, Z) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Y = 0 du biofilm entier, et de sa partie « basale », C, F : Vue selon le plan (X, Y) avec une projection de tous les domaines situés en-deçà de Z = hauteur maximum du biofilm entier, et de sa partie « basale ».

La distribution des domaines dans le biofilm entier (**Figure 84 A**) montre que 37 % sont compris entre 100 et 200 px^3. Ces domaines correspondent aux bactéries disposées dans la partie « basale », comme décrit précédemment, mais également dans la partie « supérieure » du biofilm. La contribution suivante est centrée sur 300 px^3 (correspondant à 36 % des domaines) et la troisième sur 500 px^3 (correspondant à 11 % des domaines). Par ailleurs, il est à noter que le domaine ayant le volume maximum dans ce biofilm vaut $6{,}87 \times 10^5$ px^3, ce qui est entre 3 et 4 fois supérieur aux domaines maximum des deux autres biofilms (respectivement $1{,}92 \times 10^5$ px^3 pour le biofilm constitué de bactéries seules et $1{,}72 \times 10^5$ px^3 pour celui en présence de NPs $SiNH_2$).

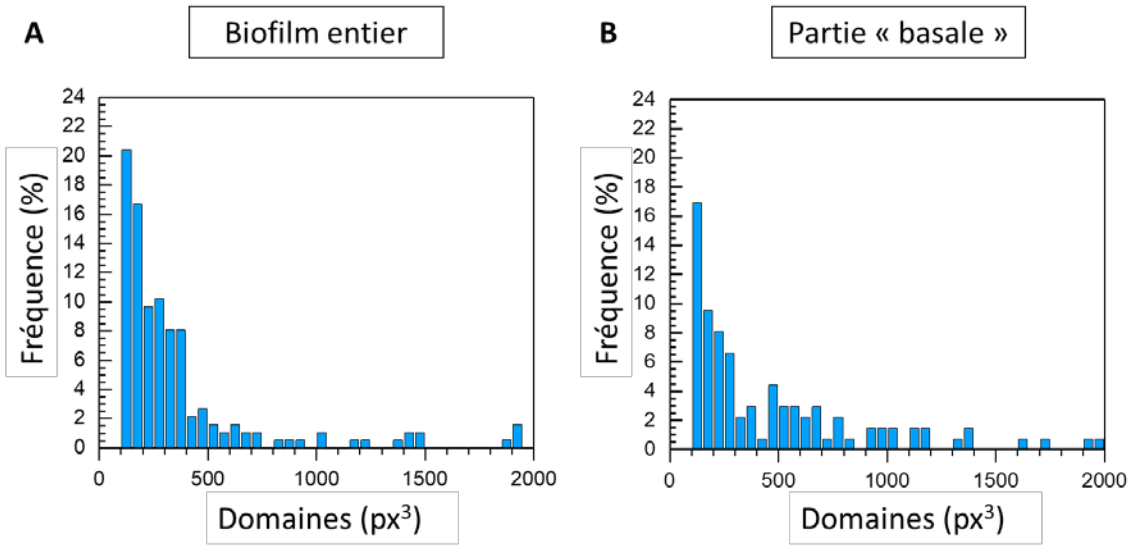


Figure 84 : Distribution des domaines du biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH normalisés par rapport au nombre total de volumes et convertis en %. A : Biofilm entier, B : Partie « basale ».

Sur la **Figure 84 B** sont représentés les domaines compris dans les tranches 1 à 20, entre 100 et 2000 px^3. Les domaines correspondant à un volume inférieur à celui des bactéries (entre 100 et 150 px^3) dans cette partie « basale » constituent 16 % de la distribution, contre 20 % dans le biofilm entier. La contribution autour de 300 px^3 correspond à 24% de la distribution, pour 36% dans le biofilm entier. A l'inverse, 13 % de la distribution constituent la contribution centrée sur 500 px^3 pour 8% dans le biofilm entier. Enfin, seuls 46,3 % du nombre total de pixels occupés au sein du biofilm sont répartis dans la partie « basale ». Cela signifie que, par rapport aux 2 précédents biofilms, celui-ci comprend davantage de domaines de faible volume dans sa partie « supérieure ». Cela traduit le fait que le biofilm est plus étendu selon Z. Dans ce sens, d'après la **Figure 85 A,** la base du biofilm semble moins compacte et peu de bactéries sont disposées horizontalement sur la surface du substrat. Il semble cependant y avoir deux groupes de bactéries disposées verticalement ou transversalement. Dans la partie supérieure (**Figure 85 B**), outre un volume important de $1,1 \times 10^4$ px^3, la majorité des volumes correspondent à des bactéries seules ou à des agglomérats de NPs. Ces agglomérats ne sont pas nécessairement issus d'un phénomène d'agrégation de NPs, causé par une domination des forces attractives de van der Waals au sein d'une suspension colloïdale. Ils proviennent potentiellement de la perception des domaines par *regionprops3* selon une connectivité-26 entre pixels (**§ II.9**), ce qui aurait pour conséquence de lier entre elles les NPs du fait de leur proximité spatiale.

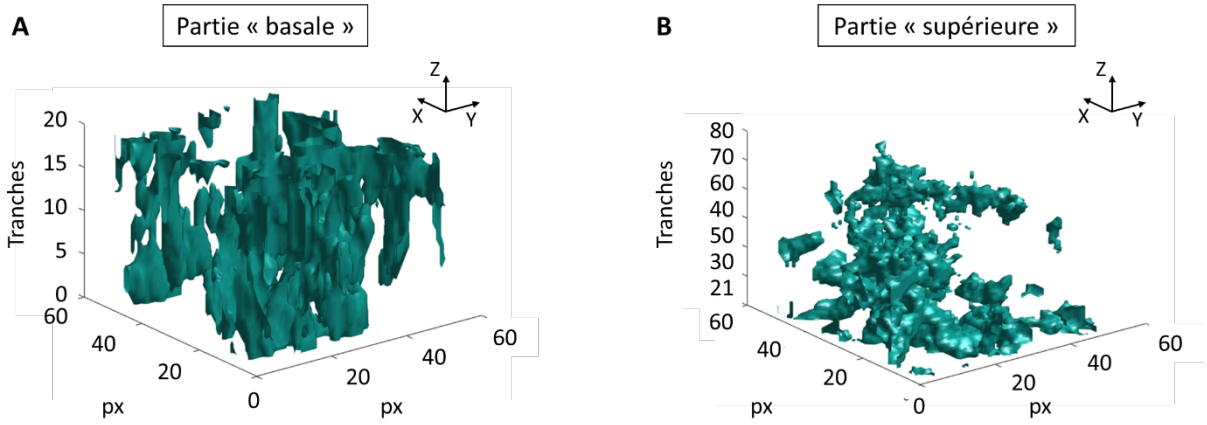


Figure 85 : Représentation 3D d'une zone carrée de dimension 50 × 50 px en (X, Y), située entre X = 150 à 200 px et Y = 150 à 200 px, du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. A : Partie « basale » de Z = 1 à 20 px, B : Partie « supérieure » constituée des tranches de Z = 21 à 80 px.

La forme de la distribution du nombre de pixels occupés par tranche bactérienne (**Figure 86**) est différente de celle des deux autres biofilms. Dans la première couche (de Z = 1 à 5 px soit *ca.* 1 µm), la même tendance est constatée que pour les précédents biofilms, à savoir que la quantité de pixels est moindre dans cette couche, que dans la couche supérieure (de Z = 6 à 10 px soit *ca.* 2 µm). Ce n'est que pour la troisième couche (Z = 11 à 15 px soit *ca.* 3 µm) que la fréquence de pixels occupés se stabilise à la valeur maximale de 14 %. A partir de la couche 5 (de Z = 20 à 25 px soit *ca.* 5 µm), le nombre de pixels occupés décroît progressivement jusqu'à atteindre moins de 1 % en fréquence pour la couche 12 (de Z = 55 à 60 px soit *ca.* 12 µm). Ainsi, seuls 46 % des pixels occupés sont répartis de Z = 1 à 20 px, soit dans 4 µm de hauteur, et ce n'est que pour Z = 31 à 35, soit dans 7 µm de hauteur, que l'on atteint les 80 % de pixels occupés.

Le biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH est donc beaucoup plus étendu dans la direction Z que les deux précédents biofilms, sa partie « basale » ayant comme « limite » la tranche 40. Certaines zones atteignent ainsi 8 µm d'épaisseur, montrant une hétérogénéité plus importante et un caractère plus « aérien » que les deux autres biofilms précédemment considérés.

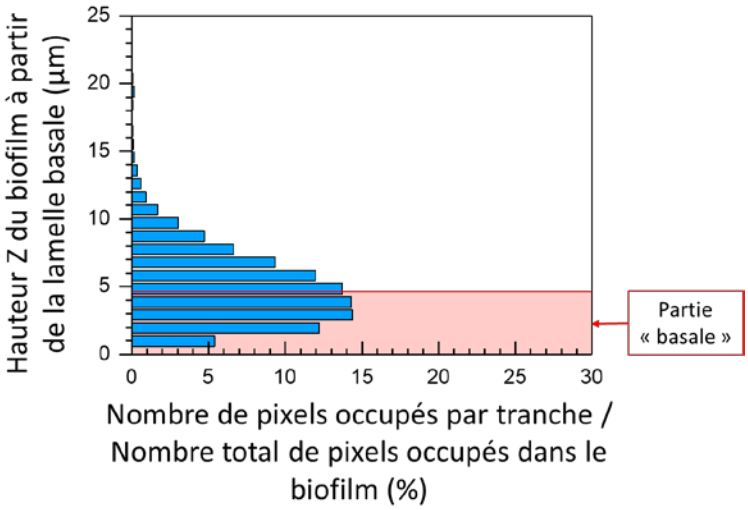


Figure 86 : Distribution représentant l'évolution du nombre de pixels occupés par tranches par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm constitué de YeeJ (E2551) et de NPs SiCOOH. Les pixels occupés sont décomptés à partir de la lamelle basale par groupe de 5 px de hauteur. Le cadre rouge délimite la partie désignée comme « basale ». La hauteur Z est en µm.

4. Etude comparative

Dans ce paragraphe sont résumées les différentes observations émises durant l'étude des 3 biofilms constitués de YeeJ (E2551), afin de déterminer l'influence des deux types de NPs sur leur structure. La **Figure 60** rassemble les principales figures discutées dans cette partie **III** et sert de support pour l'étude comparative suivante.

Dans un premier temps, les différentes représentations en 2D (MIP, épaisseur, occupation et densité), permettent de visualiser l'aspect global du biofilm. Ainsi, le biofilm constitué uniquement de bactéries YeeJ (E2551) présente une structure homogène, avec une dispersion régulière des bactéries sur la surface du substrat, sans espaces entièrement vides particulièrement conséquents à relever, contrairement aux biofilms mis en culture en présence de NPs.

En effet, sur les figures 2D d'épaisseur et d'occupation pour le biofilm comprenant des NPs $SiNH_2$, des espaces vides de 30 à 70 px² (soit de 36 à 196 µm²) ou des agrégats de 20 à 40 px² (soit de 15 à 65 µm²) sont observables. Sur les représentations 3D associées, deux cheminées principales entre 60 et 80 px de hauteur (soit respectivement 12 et 16 µm) et 50 à 60 px de largeur (soit respectivement 10 et 12 µm) se dessinent, ainsi que plusieurs autres petites cheminées d'une hauteur comprise entre 30 et 40 px, (soit entre 6,0 et 8,0 µm) et d'une dizaine de pixels de large (soit 2 µm) (**Figure 74**). De plus, pour le biofilm en présence de NPs $SiNH_2$ le taux de couverture θ vaut 0,39 alors qu'il vaut 0,59 pour les deux autres biofilms (**Tableau 12**). Cela signifie que les bactéries seraient moins étendues au sein du biofilm et davantage agrégées.

Pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, plusieurs agrégats de 50 px², soit 94 µm², sont visibles sur les différentes représentations 2D et peuvent correspondre à des agrégats de NPs ou à des complexes NPs/bactéries. Des zones vides, également de 50 px², s'intercalent entre ces agrégats. En outre, le biofilm comportant des NPs SiCOOH semble également plus épais que les deux autres biofilms.

Ensuite, l'étude de l'épaisseur moyenne des biofilms permet d'estimer le nombre de couches bactériennes dont ceux-ci sont constitués (**Tableau 12**). En effet, si l'on estime le diamètre d'une bactérie à 0,97 µm, comme décrit dans le **§ II.9**, pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules et en présence de NPs $SiNH_2$ l'épaisseur moyenne est de *ca.* 2 µm, soit 2 bactéries déposées horizontalement par rapport au substrat ou 1 verticalement, et de *ca.* 3 µm pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH. Par ailleurs, la comparaison de l'occupation moyenne des 3 biofilms montre que celui comportant des NPs SiCOOH est le plus étendu selon Z et qu'il possède donc potentiellement le plus de couches superposées.

Tableau 12 : Comparaison des valeurs d'épaisseur moyenne et de θ pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH.

Type de biofilm	Epaisseur moyenne (µm)	Occupation moyenne (px)	θ
Biofilm E2551 seules	2,0	7,2	0,59
Biofilm E2551 + NPs $SiNH_2$	1,9	7,9	0,39
Biofilm E2551 + NPs SiCOOH	2,8	9,0	0,59

Pour les 3 biofilms, les histogrammes d'épaisseurs présentent 3 contributions principales. La première correspondrait à une monocouche bactérienne, et la deuxième à une seconde couche en formation. La troisième contribution témoignerait de zones particulières ou plusieurs bactéries sont superposées ou liées entre elles par des composants de la matrice du biofilm. Cependant, la position et l'étendue de ces contributions diffèrent selon le biofilm.

En effet, même si la première contribution de la distribution de l'épaisseur du biofilm comportant des NPs $SiNH_2$ est du même ordre que pour le biofilm constitué de bactéries seules, on constate que la valeur du centre de la gaussienne est inférieure (0,47 ± 0,28 µm < 0,59 ± 0,33 µm) (**Tableau 13**). Cela pourrait par exemple traduire une altération des bactéries par les NPs (Mathelié-Guinlet *et al.* 2018, 2017). La deuxième contribution du biofilm de bactéries seules est située à 1,63 ± 0,67 µm et correspond à 26 % de la distribution totale. Pour le biofilm comportant des NPs $SiNH_2$, plus de la moitié de la distribution totale d'épaisseurs est comprise dans la deuxième contribution centrée sur 1,35 ± 0,62 µm. Cela signifie que la moitié du biofilm est à une épaisseur de *ca.* 1,4 µm. Cette différence de proportion des modes témoigne de l'agrégation des bactéries et des NPs au sein du biofilm comportant des NPs $SiNH_2$, entrainant potentiellement la création de complexes bactéries/NPs/EPS/protéines surfaciques (Choi *et al.* 2010; Flemming and Wingender 2010).

La distribution d'épaisseurs du biofilm comportant des NPs SiCOOH s'apparente à celle du biofilm constitué de bactéries seules. Cependant la troisième contribution du biofilm comportant des NPs SiCOOH est beaucoup plus étendue (3,48 ± 2,95 µm) que celle du biofilm de bactéries seules (2,94 ± 1,91 µm). Par ailleurs, un tiers des épaisseurs du biofilm comportant des NPs SiCOOH est de *ca.* 3,5 µm alors que seuls 17 % des épaisseurs du biofilm de bactérie seules est de *ca.* 3,0 µm. Cela confirme une épaisseur beaucoup plus importante du biofilm comportant des NPs SiCOOH.

Tableau 13 : Comparaison des valeurs x_c et σ_c relatives aux centres des contributions des distributions de l'épaisseur et de l'occupation, suite à l'application de modèles gaussiens, pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH.

Type de biofilm	Contribution	Epaisseur $x_c \pm \sigma_c$ (µm)	Occupation $x_c \pm \sigma_c$ (px)
Biofilm E2551 seules	1	0,59 ± 0,33	3,2 ± 1,5
	2	1,63 ± 0,67	7,1 ± 4,8
	3	2,94 ± 1,91	
Biofilm E2551 + NPs $SiNH_2$	1	0,47 ± 0,28	6,0 ± 4,5
	2	1,35 ± 0,62	
	3	2,31 ± 1,81	
Biofilm E2551 + NPs SiCOOH	1	0,57 ± 0,28	4,7 ± 3,5
	2	1,24 ± 0,72	10 ± 6,5
	3	3,48 ± 2,95	

La comparaison des distributions de l'occupation confirme ce qui a été observé lors de l'étude de l'épaisseur. En effet, pour le biofilm de bactéries seules et celui comportant des NPs SiCOOH, les deux contributions sont respectivement centrées sur 3,2 ± 1,5 px et 7,1 ± 4,8 px, et 4,7 ± 3,5 px et 10 ± 6,5 px (**Tableau 13**). Le diamètre estimé d'une bactérie est de 5 px. Ces composantes traduisent donc la présence d'une couche principale, à laquelle se superpose une ou plusieurs autres couches en fonction de l'orientation des bactéries. Pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, l'ajout de l'écart à la valeur centrale de la seconde contribution renvoie une hauteur de 10 + 6,5 = 16,5 px, ce qui équivaut à 3 bactéries superposées horizontalement ou 1 à 2 verticalement.

Concernant le biofilm comportant des NPs $SiNH_2$, l'unique composante de sa distribution d'occupation est centrée sur 6,0 ± 4,5 px (**Figure 60**). En réalité, il s'agit de deux contributions. Cependant, la seconde est trop importante et occulte la première. Cela traduit probablement un phénomène d'agrégation entre NPs et bactéries. Des hypothèses sur l'origine de cette agrégation seront abordées plus tard.

Ensuite, l'étude des densités montre que le biofilm constitué de bactéries et de NPs $SiNH_2$ présente la densité la plus importante des 3 biofilms considérés. En effet, 85 % de sa distribution en densité vaut 1 alors que pour les biofilms constitués de bactéries seules et de bactéries en présence de NPs SiCOOH il s'agit de de 75 % et de 65 %. De plus, pour ce biofilm contenant des NPs $SiNH_2$, les différentes contributions sont peu discernables sur les histogrammes d'épaisseur et d'occupation. Cela tend à confirmer une agrégation entre NPs ou l'apparition de complexes NPs/bactéries/EPS/protéine YeeJ

matérialisés par des cheminées, visibles sur les représentations 2D et 3D. En effet, la protéine YeeJ des bactéries considérées promeut l'adhésion du biofilm (Martinez-Gil *et al.* 2017) et il est ainsi probable qu'elle induise l'agrégation des NPs au sein du biofilm.

La structure du biofilm comportant des NPs SiCOOH semble différer de celle des deux autres biofilms. En effet, les distributions d'occupation s'étendent jusqu'à 25 px pour le biofilm de bactéries seules et 30 px pour le biofilm comportant des NPs $SiNH_2$, alors qu'elle atteint les 40 px pour celui comportant des NPs SiCOOH. Cela est confirmé par les observations des représentations 3D, montrant que la partie « basale » du biofilm s'étend sur 40 px (**Figure 83 B**). Néanmoins, sa densité est de 65 %. Il s'agit donc du biofilm le plus épais des 3 étudiés, mais le moins dense.

Lors de l'observation des représentations 3D des biofilms, il s'avère que pour celui constitué de bactéries seules, l'observation d'une zone de 50 × 50 px dans la partie « basale » semble montrer une couche de bactéries disposées horizontalement, et une deuxième couche où elles sont disposées verticalement (**Figure 68 A**). Dans la partie « supérieure », les bactéries sont disposées de manière diagonale (**Figure 68 B**). L'agrégation au sein du biofilm en présence de NPs $SiNH_2$ rend difficile la description de la disposition des bactéries par rapport au substrat. Une couche essentiellement constituée de bactéries verticales serait éventuellement distinguable (**Figure 77 A**).

Pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, l'observation d'une zone de 50 × 50 px dans la partie « basale » montre que les bactéries discernables semblent davantage disposées verticalement et transversalement (**Figure 85 A**). Par ailleurs, elles sont plus espacées que dans les deux autres biofilms. La partie « supérieure » présente des agrégats de NPs ou de complexes NPs/bactéries (**Figure 85 B**).

Concernant la distribution des domaines dans les biofilms entiers, le groupe correspondant aux domaines compris entre 100 et 200 px^3 correspondrait soit à des bactéries lysées ou altérées, soit à des bactéries tronquées par le plan de coupure. Deux autres principales contributions sont discernables. La première, située entre 200 et 300 px^3, correspond au volume moyen d'une bactérie, estimé sur 4 cellules distinctes, d'après un échantillon planctonique. La seconde, centrée sur 500 px^3, correspond probablement à deux bactéries collées ou en cours de division.

Afin de compléter ces hypothèses, l'étude de la distribution des domaines de la partie « basale » et de la partie « supérieure » des biofilms est menée. Elle montre que pour les biofilms constitués de bactéries seules, davantage de domaines entre 100 et 150 px^3 sont présents dans la partie « basale » (*i.e.* 24 % pour 15 % dans le biofilm entier) (**Figure 67 et 68**). Cela tend à confirmer l'hypothèse de l'existence de bactéries qui, au contact du substrat, ont vu leur taille sous-estimée par le fait du plan de coupure ne correspondant pas à Z=0. Pour le biofilm comprenant des NPs $SiNH_2$, les domaines visibles dans la partie « supérieure » semblent avoir un volume supérieur à 2000 px^3 et constituer la

cheminée principale (**Figure 76 et 77**). Enfin, pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, les domaines compris entre 100 et 200 px^3 sont davantage présents dans la partie « supérieure » (**Figure 84 et 85**).

Le décompte des pixels occupés selon des couches de Z=5 px montre que, pour les biofilms de bactéries seules ou comportant des NPs $SiNH_2$, 80 % des pixels sont présents dans les couches entre Z=1 et 20. Selon que les bactéries soient disposées horizontalement ou verticalement par rapport au substrat, deux couches pourraient composer le biofilm. Dans la partie « supérieure » du biofilm, les bactéries seraient en phase d'adhésion réversible ou d'attachement initial (Monroe 2007).

Dans le biofilm généré en présence de NPs $SiNH_2$, la distribution des domaines montre des contributions centrées sur 700 et 1000 px^3, qui ne sont pas aussi marquées dans les deux autres biofilms. Cela tendrait à confirmer l'existence d'un phénomène d'agrégation entre NPs et bactéries. En outre, la cheminée principale observée est constituée du volume de pixels le plus important de ce biofilm.

Pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, les couches comprises entre Z=1 et 20 ne contiennent que 46 % des pixels occupés. Cela signifierait que ce biofilm est constitué d'un plus grand nombre de couches bactériennes que les deux autres. Cependant, il est à noter que la première, voire les deux premières tranches de Z=5 de hauteur, contiennent moins de pixels occupés que les autres et donc potentiellement moins de bactéries. De plus, il faut considérer les 7 premières tranches pour atteindre 80 % de pixels occupés. Dans les deux autres biofilms, ce pourcentage de pixels occupés était atteint dans les 4 premières tranches. Cela est confirmé par la figure de la zone 50×50 px (**Figure 85 B**) révélant davantage d'agglomérats dans la partie « supérieure » du biofilm.

Ainsi, la distribution du nombre de pixels occupés par tranche témoigne d'une structure davantage étendue selon Z, autrement dit davantage « aérienne », pour ce biofilm. De plus, 20 % des domaines de ce biofilm sont compris entre 100 et 150 px^3, alors qu'il s'agissait de 15 % et 12 % pour le biofilm constitué de bactéries seules, et en présence de NPs $SiNH_2$ respectivement. Cette augmentation de la proportion de domaines de faible volume transcrit la dispersion de NPs au sein du biofilm, et plus précisément dans la partie « supérieure ».

En complément de ces informations, le **Tableau 14** présente (i) la proportion de quantité de pixels occupés dans la partie « basale » (de Z=1 à 20 px) par rapport au nombre total de pixels dans cette même partie « basale », et (ii) la proportion de quantité de pixels occupés dans la partie « basale » par rapport au nombre total de pixels occupés dans le biofilm, pour chaque type de biofilm observé. Pour le biofilm constitué uniquement de bactéries, 16,9 % des pixels de la « base » du biofilm sont occupés alors que seuls 12,7 % (respectivement 12,2 %) le sont pour le biofilm en présence de NPs $SiNH_2$ (respectivement de NPs SiCOOH).

Tableau 14 : Décompte du nombre de pixels occupés dans les « bases » des biofilms par rapport au nombre de pixels de la « base » et au nombre total de pixel occupés dans les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules, en présence de NPs $SiNH_2$ et en présence de NPs SiCOOH.

Type de biofilm	Nombre de pixels occupés « base » / Nombre pixels base (%)	Nombre de pixels occupés « base » / Nombre total de pixels occupés (%)
Biofilm E2551 seules	16,9	80,3
Biofilm E2551 + NPs $SiNH_2$	12,7	83,2
Biofilm E2551 + NPs SiCOOH	12,2	46,3

Pour les biofilms constitués de bactéries YeeJ (E2551) seules ou comportant des NPs $SiNH_2$, plus de 80 % des pixels occupés du biofilm sont présents dans la partie « basale ». Seuls 46 % des pixels de la « base » sont occupés pour le biofilm comportant des NPs SiCOOH, confirmant le caractère « aérien » de ce biofilm, s'expliquant potentiellement par la dispersion des NPs dans les couches supérieures.

Par ailleurs, le domaine présentant le plus important volume est présent dans le biofilm comportant des NPs SiCOOH ($6,87 \times 10^5$ px^3), et contient 3 à 4 fois plus de pixels que les domaines maximums des biofilms de bactéries seules et en présence de NPs $SiNH_2$ (respectivement $1,92 \times 10^5$ px^3 et $1,72 \times 10^5$ px^3). Cela peut être dû à la proximité importante des pixels. En effet, la perception des limites des domaines par *regionprops3* selon une connectivité-26 peut entrainer une liaison des domaines accolés uniquement *via* un coin.

Pour les trois biofilms considérés, il a été remarqué que la première tranche d'une hauteur Z de 5 px à partir de la lamelle basale, voire les deux premières dans le cas du biofilm généré en présence de NPs SiCOOH, contenait un nombre de pixels moins important que les couches immédiatement supérieures. Cela signifierait que moins de bactéries sont présentes, ou que leur taille est inférieure à celles constituant les couches supérieures.

Une des explications possibles serait que, lorsque les autres couches seront dans l'étape de maturation du biofilm, le nombre de pixels occupés serait équivalent à ceux de cette première couche. En effet, l'agencement des bactéries au sein de la matrice du biofilm est adapté de manière à optimiser les échanges nutritifs entre elles, tout en les protégeant des agressions extérieures (Flemming and Wingender 2010; Flemming *et al.* 2016; O'Toole *et al.* 2000; Whitfield *et al.* 2015) et des différentes

formes de stress (*e.g.* mécanique, oxydatif) (Choi *et al.* 2010; Costerton *et al.* 1999; Fonseca and Sousa 2007; Ordax *et al.* 2010). Ainsi, dans le cas où des bactéries lysées seraient présentes dans les couches les plus proches du substrat, elles pourraient servir de réserve nutritive aux autres bactéries de la communauté (López-León *et al.* 2005). De plus, si les bactéries des couches supérieures sont dans un état proche de l'état planctonique, elles ne seraient pas « incluses » dans la matrice du biofilm, et ne recevraient donc aucun signal leur indiquant une éventuelle réorganisation (Flemming *et al.* 2016; Kim *et al.* 2016b; Liu *et al.* 2015).

Un autre point à aborder est la constitution de complexes bactéries/NPs/EPS, malgré la charge négative des NPs $SiNH_2$ à pH 7. Ce phénomène peut trouver son origine selon plusieurs hypothèses. L'une d'entre elles serait que la matrice du biofilm forcerait une promiscuité (Birjiniuk *et al.* 2014; Flemming and Wingender 2010) qui permettrait de passer au-delà de la barrière d'énergie répulsive, de telle sorte que les NPs $SiNH_2$ et les bactéries soient en contact (Van Loosdrecht *et al.* 1990). Comme expliqué dans le **chapitre 3**, le fait que la charge des NPs $SiNH_2$ soit négative provient du fait qu'un nombre considérable de groupements hydroxyles intervient dans l'étape de fonctionnalisation des NPs. Ces NPs arborent donc des groupements NH_2 (2 groupes par nm^2) et des groupements OH. Ainsi, la promiscuité induite par la matrice du biofilm entrainerait une agrégation des NPs $SiNH_2$ entre elles et avec les bactéries. Cependant, ce phénomène n'est pas visible pour les NPs SiCOOH.

En outre, la force ionique du milieu de culture des biofilms est de l'ordre de 100 mM. Cependant, il a déjà été montré que la stabilité des suspensions de NPs $SiNH_2$ n'est plus assurée à partir d'une force ionique de 25 mM, cela se traduisant par la création d'agrégats de NPs pouvant atteindre *ca.* 400 nm de diamètre (***cf.* Figure 2a Chapitre 3**). Des agrégats de NPs ont déjà été observés à pH 7 par AFM dans le **chapitre 3** (**Figure 5**). De plus, la quantité importante de NPs présentes en solution (0,4 $g.L^{-1}$ soit $1,7 \times 10^4$ NPs par bactérie) favorise ce phénomène d'agrégation.

Par ailleurs, il a été avancé comme hypothèse dans le **chapitre 3** que le domaine passager sur la région C-terminale de la protéine surfacique YeeJ peut être arraché par les NPs. Les NPs sont ainsi possiblement décorées d'une bio-couronne composée de protéine YeeJ, ce qui aurait pour effet de favoriser l'agrégation des NPs. De plus, la matrice du biofilm, provenant de l'excrétion de biomolécules par les bactéries sous l'effet de stress extérieur (Flemming and Wingender 2010), peut modifier les propriétés de surface des NPs (Kimkes and Heinemann 2018; Majdalani *et al.* 2005). Ces bio-composants peuvent moduler les interactions physico-chimiques (*e.g.* stériques, électrostatiques, hydrophobes) entre NPs et bactéries et ainsi participer à leur mise en contact, ce qui peut entrainer une hétérogénéité de la structure du biofilm (Ikuma *et al.* 2015; Stewart and Franklin 2008).

Ainsi, il semblerait plus probable que ce soit sous l'effet de l'action combinée de la protéine adhésive YeeJ, des bio-composants de la matrice extracellulaire du biofilm, et de la tendance à l'agrégation des NPs $SiNH_2$ à salinité élevée que se forment des structures type cheminées.

Ensuite, une des pistes de compréhension de la raison de la dispersion de domaines de faibles volumes dans la partie supérieure du biofilm comprenant des NPs SiCOOH proviendrait de l'analyse des signatures électrostatiques des NPs et des bactéries décrite dans le **chapitre 3**. Ainsi, pour une force ionique équivalente à la salinité du milieu de culture, *i.e.* 100 mM, le plateau de mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique n'est pas atteint. Cela signifie que les charges de surface des NPs ne sont pas entièrement écrantées par les ions de l'électrolyte. Des interactions électrostatiques répulsives pressenties sur la base des propriétés électrostatiques des bactéries YeeJ (E2551) et des NPs SiCOOH chargées négativement, comme visible sur la **Figure 39** et la **Figure 3a** de l'article (***cf.*** **Chapitre 3**), se produiraient dans le biofilm. Il est possible que certains EPS soient également chargés négativement (Carlson and Silverstein 1998). Ainsi, ils pourraient prendre part aux interactions répulsives ayant déjà court entre les NPs et les bactéries. A ce titre, on notera que, lors des expérimentations, un dépôt blanchâtre attaché au biofilm avait été observé à la surface des biofilms comportant des NPs SiCOOH. En outre, la matrice pourrait s'organiser de telle sorte à former des canaux pour expulser des particules étrangères vers la surface du biofilm (Flemming *et al.* 2016; Okabe *et al.* 1997). Enfin, malgré une force ionique supérieure à 100 mM, il a été observé, à l'aide d'un NanoZS Zetasizer de Malvern®, que les NPs SiCOOH restent dispersées et ne forment aucun agrégat. Des interactions électrostatiques répulsives entre bactéries, NPs et EPS pourraient donc avoir pour conséquence le rejet de NPs SiCOOH vers la surface du biofilm, lui conférant un caractère « aérien ».

Par ailleurs, l'holotomographie fournissant des volumes 3D recalculés des indices de réfraction de l'échantillon, il a été envisagé d'étudier les distributions de ces indices afin de différencier les contributions des NPs, des bactéries ou du milieu ionique. Cependant, les valeurs des indices de réfraction des différents composants du biofilm étaient trop rapprochées pour permettre une discrimination nette. En effet, l'indice de réfraction des *Escherichia coli* est compris entre 1,3 et 1,4 (Tripathi *et al.* 2012), et celui des NPs Si est de *ca.* 1,4 (Khlebtsov *et al.* 2008).

L'holotomographie est ainsi une technique de microscopie permettant d'étudier des échantillons biologiques *in situ* dans leur état naturel, sans l'utilisation de fluorophore, avec une résolution importante et en 3 dimensions. De plus, la reconstruction des volumes à partir des RI permettrait d'étudier une image quantitative (Yang *et al.* 2013a). Cependant, les RI des différents composants de l'échantillon doivent être suffisamment différents afin de pouvoir les isoler les uns des autres. Par

ailleurs, il serait intéressant d'utiliser en parallèle une technique de microscopie à fluorescence afin d'obtenir des informations complémentaires concernant la répartition des différents composants ou de la matrice du biofilm. La microscopie à force atomique permettrait également d'obtenir des informations sur la capacité d'adhésion de NPs sur des surfaces biotiques à partir de la mesure des forces entre les entités interagissant (Beaussart *et al.* 2018a; Fang *et al.* 2000; Pericet-Camara *et al.* 2009; Popa *et al.* 2010) afin d'ainsi mener à une compréhension plus fine des mécanismes d'interactions entre bactéries et NPs à l'échelle du biofilm.

Conclusion générale

L'essor de l'utilisation de NPs manufacturées conduit inévitablement à s'interroger sur leur dissémination et leur devenir au sein de l'environnement et, plus particulièrement, au sein des milieux aquatiques. Les bactéries peuplant ces milieux font partie des microorganismes concernés par ces rejets de NPs. Cette thèse s'est donc attachée à la compréhension des interactions physico-chimiques entre NPs et bactéries, à l'état planctonique et de biofilm. A ce titre, l'influence des groupements surfaciques des NPs de silice, ainsi que celle des biostructures pariétales bactériennes de souches *E. coli*, sur ces interactions ont été mises en avant.

Dans cette optique, le chapitre 3 présente la mise en place d'une méthode de détection des conséquences des actions des NPs sur les bactéries par le biais de leurs signatures électrocinétiques. Ces signatures reflètent les modifications physico-chimiques de la surface des particules considérées, suite à leurs interactions (*e.g.* van der Waals, électrostatique, stérique, hydrophobe). A l'aide de l'électrophorèse, une caractérisation préalable des systèmes isolés a été faite sur une gamme de force ionique de 0,1 à 250 mM à différents pH. Il a ainsi été montré qu'une inversion du signe de la charge de surface des NPs est constatée entre les pH 5 et 6. Elle est due à la dissociation, pour des pH supérieurs à 6, des groupements hydroxyles résiduels issus de la méthode de synthèse des NPs. Ensuite, l'application du modèle physique analytique d'Ohshima pour les particules molles a démontré une non-idéalité de la surface des NPs, constituée des groupements fonctionnels terminaux. Les bactéries présentent, quant à elles, une charge négative de surface comme attendue. La présence de biostructures surfaciques influe sur cette charge, de même que le pH et la force ionique du milieu dans lequel elles sont dispersées.

Pour les systèmes binaires NPs $SiNH_2$/bactéries, il a été montré que, à pH naturel *ca.* 7, l'analyse des signatures électrophorétiques ne reflète aucune modification des propriétés électro-hydrodynamiques des bactéries nues (E2152), ou décorées de protéines adhésives YeeJ (E2551), quel que soit la concentration en NPs. Les interactions électrostatiques répulsives sont dominantes. Une modification des propriétés électro-hydrodynamiques est à noter pour les bactéries présentant à leur surface de longs filaments protéiques appelés pili-F (E2302). Il est possible que les pili permettent de franchir la barrière d'énergie répulsive existante entre les NPs et les bactéries, chargées négativement. Les NPs sont alors piégées par les pili, et il en suit une faible modification des propriétés physico-chimiques de surface des bactéries.

A pH 3, une modification de la signature électrophorétique des bactéries et des NPs est constatée avec l'augmentation de la concentration en NPs. Cela témoigne de l'existence d'interactions attractives entre les NPs $SiNH_2$, chargées positivement, et les bactéries, chargées négativement, ayant entrainé une modification de leurs propriétés physico-chimiques de surface respectives. Ces modifications peuvent être une adsorption des NPs sur la membrane externe des bactéries, l'abrasion de la surface bactérienne par les NPs, la membrane étant déjà fragilisée par l'acidité du milieu, et l'acquisition par les NPs d'une couronne protéique. En outre, il apparaît que la protéine YeeJ à la surface des bactéries E2551 favorise les interactions avec les NPs. Le comportement des bactéries pili-F (E2302) en présence de NPs semble être intermédiaire entre celui des bactéries YeeJ (E2551) et celui des bactéries nues (E2152).

Sur une gamme de pH et de force ionique identique à celle établie pour les NPs $SiNH_2$, les NPs SiCOOH demeurent chargées négativement. A pH 7 pour une force ionique de 1 mM, leurs valeurs de mobilité électrophorétique sont proches de celles des bactéries YeeJ (E2551). Ainsi, dans le cas de l'étude des systèmes binaires NPs SiCOOH / YeeJ (E2551), l'utilisation de l'électrophorèse ne permet pas de déceler des modifications structurales de la surface des particules considérées.

L'utilisation de l'électrophorèse sur des systèmes binaire NPs/bactéries a ainsi permis de détecter (i) les signatures électrostatiques des premiers stades d'interactions, (ii) les changements des caractéristiques électro-hydrodynamiques des bactéries et des NPs dus aux modifications de la surface des bactéries et à l'acquisition d'une couronne protéique par les NPs, suite au relargage de composés cellulaires, et (iii) une forte dépendance des propriétés électrocinétiques des cellules et des NPs à la concentration en NPs, au pH de la solution, et à la nature des biostructures pariétales bactériennes.

L'observation de la morphologie des cellules par AFM a permis de renforcer les conclusions obtenues par électrophorèse. L'analyse d'échantillons, en liquide, comprenant des bactéries et des NPs, dans des conditions similaires à celles de l'électrophorèse, a permis de montrer les modifications des structures bactériennes du fait du pH acide et de la présence de NPs. En effet, la détermination de la rugosité de surface, par la mise en place d'une procédure basée sur un filtre Gaussien, a montré que l'effet combiné de l'acidité du milieu et de la présence des NPs a pour conséquence une modification de la surface des bactéries. D'une part, l'acidité du milieu accroît la rugosité de surface pour les bactéries YeeJ (E2551) et semble lisser la surface des bactéries pili-F (E2302). D'autre part, l'observation des surfaces des bactéries Nues (E2152) et YeeJ (E2551) à pH 3 en présence de NPs montre des cratères pouvant correspondre aux dimensions des NPs. La rugosité des nues E2152 en est accrue, contrairement à celle des YeeJ (E2551). En effet, à pH 3 la surface des bactéries YeeJ (E2551) présente des sphéroïdes, probablement des vésicules de la membrane externe. Ainsi, une des

explications possibles à la diminution de la rugosité de ces bactéries est que les NPs abrasent la surface des bactéries. Enfin, à pH 7, la présence de NPs tend à lisser la surface des bactéries présentant des biostructures surfaciques.

Le chapitre suivant, plus exploratoire, a été consacré à l'étude d'images 3D de biofilms bactériens issus de la souche YeeJ (E2551), générés ou non en présence de NPs. Ces images ont été obtenues par holotomographie avec un appareil de la marque Tomocube®. Le développement de différents proxys, à l'aide du logiciel Matlab, a permis l'analyse de la structure de ces biofilms. Ainsi, la structure du biofilm constitué de bactéries YeeJ (E2551), généré en présence de $SiNH_2$, présente d'une part des zones vides et d'autre part des zones constituées d'agrégats de NPs et de bactéries. Des cheminées sont visibles depuis la partie « basale » du biofilm et s'étendent vers la partie « supérieure ». Si l'on omet la hauteur de ces cheminées, l'épaisseur du biofilm est d'une valeur comparable à celui constitué de bactéries YeeJ (E2551) seules. Les conditions de culture du biofilm sont telles que les bactéries et les NPs présentent une charge négative, des interactions répulsives entre ces deux types de particules sont donc attendues. Cependant, la formation d'agrégats et de plusieurs cheminées est constatée. Cette structure particulière du biofilm pourrait provenir de la tendance à l'agrégation des NPs $SiNH_2$ pour une force ionique élevée (ici *ca.* 100 mM), de la présence de la protéine YeeJ, dont la fonction est de promouvoir l'adhésion des cellules bactériennes sur une surface abiotique, et/ou de l'excrétion de différents biocomposants constituant la matrice du biofilm qui pourraient moduler les interactions physico-chimiques entre NPs et bactéries.

Dans le biofilm généré en présence de NPs SiCOOH, la partie « basale » du biofilm semble s'étendre davantage en hauteur que pour le biofilm constitué de bactéries seules ou en présence de NPs $SiNH_2$. La structure plus « aérienne » de ce biofilm pourrait s'expliquer par le fait que les NPs SiCOOH restent dispersées malgré une force ionique importante. Des interactions électrostatiques répulsives pourraient se produire entre ces NPs, les bactéries et les constituants de la matrice du biofilm, ce qui aurait pour conséquence le déplacement des NPs SiCOOH vers la partie « supérieure » du biofilm.

Dans cette démarche de compréhension des interactions physico-chimiques entre des NPs de silice, présentant une surface fonctionnalisée, et des bactéries *E. coli*, possédant différents types de biostructures de surface, l'utilisation de l'électrophorèse a montré son potentiel de détection des signatures de modifications des structures, en conséquence des interactions NPs/bactéries. L'AFM a également montré son intérêt pour permettre l'observation, en détails et à l'échelle de la cellule unique, ces modifications structurales. Enfin, les différents proxys sélectionnés pour l'étude des images obtenues par holotomographie ont montré les différences dans l'organisation des biofilms

bactériens selon qu'ils soient générés avec des NPs présentant des groupements surfaciques amines ou carboxyliques.

Ainsi, cette thèse représente une avancée supplémentaire pour la compréhension et la prédiction des impacts des nouveaux contaminants, comme les NPs, sur les microorganismes. Le prochain objectif consiste à relier les comportements décelables à l'échelle de la bactérie planctonique à ceux constatés au sein d'un biofilm. Parvenir à une compréhension générique des mécanismes gouvernant ces interactions permettrait d'appréhender des scénarios réalistes de dissémination des particules dans l'environnement.

Perspectives

Dans un premier lieu, une des perspectives les plus évidentes serait d'étendre les mesures de mobilité électrophorétique, appliquées à des systèmes mixtes, à des bactéries présentant d'autres types d'appendices surfaciques *e.g.* fimbriae, flagelles ou d'autres protéines surfaciques comme l'Ag43. Il serait intéressant de savoir quels types d'interactions auraient lieu entre ces bactéries et les NPs $SiNH_2$ à des pH et force ioniques identiques à ceux sélectionnés dans cette étude. Par ailleurs, l'utilisation de l'électrophorèse comme outil de détection des modifications des propriétés physico-chimiques de deux types de particules colloïdales, constituant des systèmes binaires, peut s'étendre à d'autres types de NPs, de bactéries et/ou de microorganismes.

L'utilisation du mode spectroscopie de force de l'AFM permettrait d'accéder aux propriétés mécaniques, visco-élastiques et adhésives des surfaces des bactéries considérées. Il serait ainsi possible d'analyser les effets des NPs sur les biosurfaces bactériennes en termes de dommages surfaciques. Il est également envisageable de fonctionnaliser les pointes AFM par des NPs afin de (i) quantifier les forces d'interaction entre la NP attachée sur l'apex et la surface bactérienne, en fonction de la distance qui les sépare, (ii) repérer les sites d'adhésion des NPs et (iii) confirmer le rôle des appendices pariétaux bactériens dans les interactions NPs/bactéries par comparaison des souches bactériennes et des NPs. Enfin, la fonctionnalisation de pointes par des anticorps anti-YeeJ constitue une piste pour rendre compte de la répartition de la protéine YeeJ à la surface des bactéries. En déplaçant la pointe sur la biosurface, l'anticorps viendrait se lier aux antigènes YeeJ, générant une force adhésive visible sur les courbes AFM. Il serait alors possible de cartographier la distribution surfacique de la protéine YeeJ et potentiellement d'infirmer ou de confirmer l'hypothèse de formation de sphéroïdes protéiques surfaciques.

A propos de l'étude de la structure des biofilms à partir d'images obtenues par holotomographie, l'application des proxys sélectionnés sur les biofilms constitués de bactéries présentant des pili-F (E2302) permettrait de constater les différences de leur structure, par rapport à ceux composés de bactéries YeeJ (E2551), en présence, ou non, de NPs. De même, il serait intéressant d'observer l'influence de la concentration en NPs sur la structure du biofilm. D'autres proxys peuvent également être développés. Par exemple, la détermination de la position en Z du pixel le plus éloigné du plan basal, situé en Z=0, pour chaque colonne de pixels de l'image 3D, permettrait d'obtenir un profil de la hauteur du biofilm. Il serait alors possible d'évaluer sa rugosité. En outre, l'analyse de la distribution des indices de réfraction, à condition que ceux des deux types de particules considérées aient des

valeurs suffisamment éloignées, pourrait permettre de déterminer précisément la répartition des NPs au sein du biofilm, et par rapport aux bactéries.

Dans notre cas, le diamètre des NPs étant inférieur ou proche de la limite de résolution de l'appareil, il n'est pas possible de visualiser directement les NPs au sein du biofilm. Pour observer leur répartition dans le biofilm, et non uniquement leurs effets sur leur structure, l'utilisation d'un microscope confocal serait adaptée. En outre, la microscopie confocale à fluorescence permettrait, par le biais de l'utilisation de sondes fluorescentes marquant les composants de la matrice, comme la Concanavaline A marquant le mannose, de rendre compte de l'agencement des NPs au sein du biofilm.

Ces pistes constituent des propositions quant à l'affinage de la question du passage d'échelles (cellule unique vers biofilm) afin de comprendre en quoi les différents types d'interactions influent sur la répartition des NPs au sein du biofilm, ainsi que sur leur construction. Le développement de ces axes de recherche permettrait l'accès à une meilleure compréhension des mécanismes de dispersion des NPs au sein de l'environnement.

Valorisations scientifiques

Publication

E. Vouriot, I. Bihannic, A. Beaussart, Y. Waldvogel, A. Razafitianamaharavo, T. Ribeiro, J.P.S. Farinha, C. Beloin, J.F.L. Duval. Electrophoresis as a simple method to detect deleterious actions of engineered nanoparticles on living cells. *Environmental Chemistry*, Septembre 2019, DOI: 10.1071/EN19190.

Communications orales

E. Vouriot, A. Beaussart, I. Bihannic, J.F.L. Duval, Transfert des nanoparticules dans les biofilms : effets des biostructures pariétales et de la physicochimie particulaire. *DocDay LIEC 2018*, Juin 2018, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

E. Vouriot, A. Beaussart, I. Bihannic, J.F.L. Duval, Transfert des nanoparticules dans les biofilms : effets des biostructures pariétales et de la physicochimie particulaire. *Séminaire SIReNa 2019*, Février 2019, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Posters

E. Vouriot, A. Beaussart, I. Bihannic, J.F.L. Duval, Nanoparticles transfer in 3D biofilms: effects of bacterial cell-wall structures and nanoparticles physico-chemical properties. *Séminaire RP2E*, Février 2018, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

E. Vouriot, A. Beaussart, I. Bihannic, J.F.L. Duval, Nanoparticles transfer in 3D biofilms: effects of bacterial cell-wall structures and nanoparticles physico-chemical properties. *DocDay LIEC 2018*, Juin 2018, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Références

Abadeer, N.S., Fülöp, G., Chen, S., Käll, M., Murphy, C.J., 2015. Interactions of bacterial lipopolysaccharides with gold nanorod surfaces investigated by refractometric sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 24915–24925. https://doi.org/10.1021/acsami.5b08440

Abbe, E., 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikr. Anat.* **9**, 413–468. https://doi.org/10.1007/BF02956173

Abdelhamid, H.N., Wu, H.F., 2013. Probing the interactions of chitosan capped CdS quantum dots with pathogenic bacteria and their biosensing application. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6094–6106. https://doi.org/10.1039/c3tb21020k

Åkesson, A., Cárdenas, M., Elia, G., Monopoli, M.P., Dawson, K.A., 2012. The protein corona of dendrimers: PAMAM binds and activates complement proteins in human plasma in a generation dependent manner. *RSC Adv.* **2**, 11245–11248. https://doi.org/10.1039/c2ra21866f

Aldeek, F., Mustin, C., Balan, L., Roques-Carmes, T., Fontaine-Aupart, M.-P., Schneider, R., 2011. Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms. *Biomaterials* **32**, 5459–5470. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.019

Ali, A., Abouleila, Y., Amer, S., Furushima, R., Emara, S., Equis, S., Cotte, Y., Masujima, T., 2016. Quantitative live single-cell mass spectrometry with spatial evaluation by three-dimensional holographic and tomographic laser microscopy. *Anal. Sci.* **32**, 125–127. https://doi.org/10.2116/analsci.32.125

Alsteens, D., Trabelsi, H., Soumillion, P., Dufrêne, Y.F., 2013 . Multiparametric Atomic Force Microscopy imaging of single bacteriophages extruding from living bacteria. *Nature Communications.* **4**, 1–7. https://doi.org/10.1038/ncomms3926

Alsteens, D., Müller, D.J., Dufrêne, Y.F., 2017. Multiparametric Atomic Force Microscopy imaging of biomolecular and cellular systems. *Acc. Chem. Res.* **50**, 924–931. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00638

André, G., 2010. The cell wall of lactic bacteria: a nanoscale view. Université catholique du Louvain.

Baird, F.J., Wadsworth, M.P., Hill, J.E., 2012. Evaluation and optimization of multiple fluorophore analysis of a Pseudomonas aeruginosa biofilm. *J. Microbiol. Methods* **90**, 192–196. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.004

Barroso, M.M., 2011. Quantum dots in cell biology. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 237–251. https://doi.org/10.1369/0022155411398487

Baudin, M., Cinquin, B., Sclavi, B., Pareau, D., Lopes, F., 2017. Understanding the fundamental mechanisms of biofilms development and dispersal: BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement), a new tool for studying biofilms as a function of their architecture and fluorescence intensity. *J. Microbiol. Methods* **140**, 47–57. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.021

Beaussart, A., Abellán-Flos, M., El-Kirat-Chatel, S., Vincent, S.P., Dufrêne, Y.F., 2016. Force nanoscopy as a versatile platform for quantifying the activity of antiadhesion compounds targeting bacterial pathogens. *Nano Lett.* **16**, 1299–1307. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04689

Beaussart, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Chapot-Chartier, M.-P., Kulakauskas, S., Duval, J.F.L., 2018a. Probing the influence of cell surface polysaccharides on nanodendrimer binding to Gram-negative and Gram-positive bacteria using single-nanoparticle force spectroscopy. *Nanoscale* **10**, 12743–12753. https://doi.org/10.1039/c8nr01766b

Beaussart, A., Caillet, C., Bihannic, I., Zimmermann, R., Duval, J.F.L., 2018b. Remarkable reversal of electrostatic interaction forces on zwitterionic soft nanointerfaces in a monovalent aqueous electrolyte: An AFM study at the single nanoparticle level. *Nanoscale* **10**, 3181–3190. https://doi.org/10.1039/c7nr07976a

Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.* **218**, 48–68. https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007

Beech, I.B., Smith, J.R., Steele, Andrew A. Penegar, I., Campbell, S.A., 2002. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **23**, 231–247. https://doi.org/10.1002/1521-3900(200205)181:1<467::AID-MASY467>3.0.CO;2-3

Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J., 2010. Escherichia coli biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 249–389. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12

Benz, R., 1990. Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells. *Experientia* **46**, 131–137. https://doi.org/10.1007/BF02027308

Benz, R., Bauer, K., 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* **176**, 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1432-

1033.1988.tb14245.x

Berg, H.C., 2004. E.coli in Motion, Biological. ed. Springer, Oak Ridge.

Beveridge, T.J., Davies, J.A., 1983. Cellular responses of Bacillus subtilis and Escherichia coli to the Gram stain. *J. Bacteriol.* **156**, 846–858.

Beveridge, T.J., Graham, L.L., 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 684–705. https://doi.org/0146-0749/91/040684-22$02.00/0

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

Birjiniuk, A., Billings, N., Nance, E., Hanes, J., Ribbeck, K., Doyle, P.S., 2014. Single particle tracking reveals spatial and dynamic organization of the Escherichia coli biofilm matrix. *New J. Phys.* **16**. https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/8/085014

Bloomfield, V., Chu, B., Ford, N., Han, C., Mazer, N., Patterson, G., Pecora, R., Pusey, P., Schaefer, D., Tanaka, T., Tough, R., Zero, K., 1985. Dynamic light scattering applications of photon correlation spectroscopy.

Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**, 20–26. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M.F., Fiévet, F., 2006. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* **6**, 866–870. https://doi.org/10.1021/nl052326h

Breuer, H., 2000. Atlas de la chimie, 1st ed. Le Livre de Poche.

Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M.N., Fontaine-Aupart, M.P., 2008. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2135–2143. https://doi.org/10.1128/AEM.02304-07

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Briandet, R., 2014. Section 1 Destructive and nondestructive methods. *Biofouling Methods* 139.

Bryers, J.D., Drummond, F., 1998. Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 462–473. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981120)60:4<462::AID-BIT8>3.0.CO;2-K

Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, 17–71. https://doi.org/10.1116/1.2815690

CAD Instrumentation, 2006. Operating manual Zetaphoremeter IV ZetaCOMPACT 'Cad instrumentation. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Caffrey, P., Owen, P., 1989. Purification and N-terminal sequence of the alpha subunit of antigen 43, a unique protein complex associated with the outer membrane of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **171**, 3634–3640. https://doi.org/10.1128/JB.171.7.3634-3640.1989

Camesano, T.A., Natan, M.J., Logan, B.E., 2000. Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 4563–4572. https://doi.org/10.1021/la990805o

Carlson, G., Silverstein, J., 1998. Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter. *Water Res.* **32**, 1580–1592. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00354-0

Cha, S.H., Hong, J., McGuffie, M., Yeom, B., Vanepps, J.S., Kotov, N.A., 2015. Shape-dependent biomimetic inhibition of enzyme by nanoparticles and their antibacterial activity. *ACS Nano* **9**, 9097–9105. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03247

Chai, H., Yao, J., Sun, J., Zhang, C., Liu, W., Zhu, M., Ceccanti, B., 2015. The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94**, 490–495. https://doi.org/10.1007/s00128-015-1485-9

Chapman, D.L., 1913. LI. A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philos. Mag. Ser. 6* **25**, 475–481. https://doi.org/10.1080/14786440408634187

Chávez de Paz, L.E., Resin, A., Howard, K.A., Sutherland, D.S., Wejse, P.L., 2011. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on Streptococcus mutans biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3892–3895. https://doi.org/10.1128/AEM.02941-10

Chen, C.Z., Cooper, S.L., 2002. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* **23**, 3359–3368. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00036-4

Chen, Z.Z., Cai, L., Chen, M.Y., Lin, Y., Pang, D.W., Tang, H.W., 2015. Indirect immunofluorescence detection of E. coli O157:H7 with fluorescent silica nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **66**, 95–102. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.007

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668.

https://doi.org/10.1021/nl052396o

Choi, O., Yu, C.-P., Esteban Fernández, G., Hu, Z., 2010. Interactions of nanosilver with Escherichia coli cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* **44**, 6095–6103. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.069

Coles, H.J., Jennings, B.R., Morris, V.J., 1975. Infrared scattering: A method for evaluating the mass and size of bacteria. *Phys. Med. Biol.* **20**, 225–234. https://doi.org/10.1088/0031-9155/20/2/004

Coltharp, C., Xiao, J., 2012. Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.* **14**, 1808–1818. https://doi.org/10.1111/cmi.12024

Costa, T.R.D., Ilangovan, A., Ukleja, M., Redzej, A., Santini, J.M., Smith, T.K., Egelman, E.H., Waksman, G., 2016. Structure of the bacterial sex F pilus reveals an assembly of a stoichiometric protein-phospholipid complex. *Cell* **166**, 1436–1444. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.025

Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 217–221.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711–745.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persitent infections. *Science (80-.).* **284**, 1318–1322. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318

Crucho, C.I.C., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2017. Functional group coverage and conversion quantification in nanostructured silica by 1 H NMR. *Anal. Chem.* **89**, 681–687. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03117

Culha, O., Gunerhan, H., Biyik, E., Ekren, O., Hepbasli, A., 2015. Heat exchanger applications in wastewater source heat pumps for buildings: A key review. *Energy Build.* **104**, 215–232. https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2015.07.013

Dague, E., 2006. Physico-chimie des interfaces bactérie - solution aqueuse. Université Henri Poincaré - Nancy 1.

Dague, E., Duval, J., Jorand, F., Thomas, F., Gaboriaud, F., 2006. Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis. *Biophys. J.* **90**, 2612–2621. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.068205

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (80-.).* **280**, 295–298. https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295

Delay, M., Frimmel, F.H., 2012. Nanoparticles in aquatic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 583–592. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5443-z

Derjaguin, B., Landau, L., 1993. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **43**, 30–59. https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L

Doyle, R.J., 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect.* **2**, 391–400. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00328-2

Dufrêne, Y.F., 2008. Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 674–680. https://doi.org/10.1038/nrmicro1948

Dufrêne, Y.F., 2004. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat. Rev.* **2**, 451–460. https://doi.org/10.1038/nrmicro905

Dufrêne, Y.F., 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.* **184**, 5205–5213. https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5205

Duval, J.F.L., 2017. Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles: A dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 11802–11815. https://doi.org/10.1039/c7cp01750b

Duval, J.F.L., Gaboriaud, F., 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 184–195. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.002

Duval, J.F.L., Ohshima, H., 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* **22**, 3533–3546. https://doi.org/10.1021/la0528293

El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 283–287. https://doi.org/10.1021/es1034188

Escobar, B., Huerta, G., Rubio, J., 1997. Short communication: Influence of lipopolysaccharides on the attachment of Thiobacillus ferrooxidans to minerals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 593–594. https://doi.org/10.1023/A:1018585930229

Even, C., Marlière, C., Ghigo, J.M., Allain, J.M., Marcellan, A., Raspaud, E., 2017. Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. *Adv. Colloid Interface Sci.* https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.026

Fabrega, J., Fawcett, S.R., Renshaw, J.C., Lead, J.R., 2009. Silver nanoparticle impact on bacterial growth effect of pH. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7285–7290. https://doi.org/10.1021/es803259g

Fang, H.H.P., Chan, K.Y., Xu, L.C., 2000. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *J. Microbiol. Methods* **40**, 89–97. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00137-2

Faye, N., Gammoudi, I., Moroté, F., 2013. Phase behavior and structure properties of supported lipid monolayers and bilayers in interaction with silica nanoparticles. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **7**, 1594–1601. https://doi.org/1307-6892/2527

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **4**, 343–346. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379

Fisher, E., 1894. The influence of configuration on enzyme activity (Translated from German). *Dtsch Chem Ges* **27**, 2984–2993.

Fleischer, C.C., Payne, C.K., 2014. Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2651–2659. https://doi.org/10.1021/ar500190q

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Fonseca, A.P., Sousa, J.C., 2007. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa with antibiotic-induced morphological changes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**, 236–241. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.011

Formosa-Dague, C., Feuillie, C., Beaussart, A., Derclaye, S., Kucharíková, S., Lasa, I., Van Dijck, P., Dufreîne, Y.F., 2016. Sticky matrix: Adhesion mechanism of the staphylococcal polysaccharide intercellular adhesin. *ACS Nano* **10**, 3443–3452. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07515

Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J.M., Merlin, C., Beloin, C., Duval, J.F.L., 2011. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of escherichia coli cells subjected to osmotic stress. *PLoS One* **6**. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020066

Fruijtier-Pölloth, C., 2012. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-A nanostructured material. *Toxicology* **294**, 61–79. https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.001

Gaboriaud, F., Dague, E., Bailet, S., Thomas, F., 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of Shewanella putrefaciens as a response to pH change. *Colloids surfaces B* **52**, 108–116. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.017

Gaboriaud, F., Dufrêne, Y.F., 2007. Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **54**, 10–19. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.09.014

Genevaux, P., Muller, S., Bauda, P., 1996. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of Escherichia coli K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**, 27–30. https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00237-6

Gordon, C.A., Hodges, N.A., Marriott, C., 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived pseudomonas aeruginosa. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 667–674. https://doi.org/10.1093/jac/22.5.667

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut.* **181**, 287–300. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003

Gouy, M., 1910. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J. Phys. Théorique Appliquée* **9**, 457–468. https://doi.org/10.1051/jphystap:019100090045700

Graham, T., 1861. Liquid Diffusion Applied to Analysis. *Philos. Trans.* **151**, 273–276.

Greensted, A., 2010. Otsu thresholding [WWW Document]. *Lab B. Pages*. URL http://www.labbookpages.co.uk/software/imgProc/otsuThreshold.html

Guiot, E., Georges, P., Brun, A., Fontaine-Aupart, M.P., Bellon-Fontaine, M.N., Briandet, R., 2002. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation. *Photochem. Photobiol.* **75**, 570–578. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)075<0570:hodimb>2.0.co;2

Guo, Z., Xue, J., Liu, T., Song, X., Shen, Y., Wu, H., 2014. Antibacterial mechanisms of silica/polydopamine/silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Micro Nano Lett.* **9**, 210–214. https://doi.org/10.1049/mnl.2014.0014

Habimana, O., Steenkeste, K., Fontaine-Aupart, M.P., Bellon-Fontaine, M.N., Kulakauskas, S., Briandet, R., 2011. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 367–368. https://doi.org/10.1128/AEM.02163-10

Hardij, J., Cecchet, F., Berquand, A., Gheldof, D., Chatelain, C., Mullier, F., Chatelain, B., Hardij, J., Cecchet, F., Berquand, A., Gheldof, D., Chatelain, C., 2013. Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: Comparison of air-tapping-mode AFM and liquid peak force AFM. *J. Extracell. Vesicles* **3078**. https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.21045

Hayden, S.C., Zhao, G., Saha, K., Phillips, R.L., Li, X., Miranda, O.R., Rotello, V.M., El-Sayed, M.A., Schmidt-Krey, I., Bunz, U.H.F., 2012. Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 6920–6923. https://doi.org/10.1021/ja301167y

Helmholtz, H., 1879. Studien über electrische Grenzschichten. *Ann. der Phys. und Chemie* **7**, 337–382.

Henche, A.-L., Koerdt, A., Ghosh, A., Albers, S.-V., 2012. Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein: Crenarchaeal biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **14**, 779–793. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02638.x

Hetrick, E.M., Shin, J.H., Paul, Heather, S., Schoenfisch, M.H., 2009. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 2782–2789. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.052.Anti-Biofilm

Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L., 2012. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. *J. Struct. Biol.* **178**, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.02.007

Hill, R.J., Saville, D.A., Russel, W.B., 2003. Electrophoresis of spherical polymer-coated colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* **258**, 56–74. https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00043-7

Ikuma, K., Decho, A.W., Lau, B.L.T., 2015. When nanoparticles meet biofilms-interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. *Front. Microbiol.* **6**, 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00591

Israelachvili, J., Pashley, R., 1982. The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance. *Nature* **300**, 341–342. https://doi.org/0028-0836/82/470341-02$01.00

Israelachvili, J.N., 2011a. Intermolecular and surface forces, Academic P. ed 'Industrial & Engineering Chemistry. Elsevier. https://doi.org/10.1021/ie50534a061

Israelachvili, J.N., 2011b. Solvation, structural, and hydration forces 'Intermolecular and Surface Forces. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375182-9.10015-6

Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T., 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **184**, 290–301. https://doi.org/10.1128/JB.184.1.290-301.2002

Jacobson, K.H., Gunsolus, I.L., Kuech, T.R., Troiano, J.M., Melby, E.S., Lohse, S.E., Hu, D., Chrisler, W.B., Murphy, C.J., Orr, G., Geiger, F.M., Haynes, C.L., Pedersen, J.A., 2015. Lipopolysaccharide density and structure govern the extent and distance of nanoparticle interaction with actual and model bacterial outer membranes. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 10642–10650. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01841

Jacquot, A., Sakamoto, C., Razafitianamarahavo, A., Caillet, C., Merlin, J., Fahs, A., Ghigo, J.-M., Duval, J.F.L., Beloin, C., Francius, G., 2014. The dynamics and pH-dependence of Ag43 adhesins' self-association probed by atomic force spectroscopy. *Nanoscale* **6**, 12665–12681. https://doi.org/10.1039/C4NR03312D

Johnsen, A.R., Hausner, M., Schnell, A., Wuertz, S., 2000. Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in Sphingomonas biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3487–3491.

Jouenne, T., 2016. Biofilms bactériens. *Tech. l'ingénieur, Bioprocédés* **33**.

Ju-Nam, Y., Lead, J.R., 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* **400**, 396–414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Kaback, H., 1990. Bacterial membranes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **4**, 99–120. https://doi.org/10.1080/13102818.1990.10819337

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic Escherichia coli. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818

Kaszuba, M., 2015. Dynamic light scattering overview-Malvern Instruments.

Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M.T., McNeil-Watson, F.K., Nobbmann, U., 2008. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 823–829. https://doi.org/10.1007/s11051-007-9317-4

Khlebtsov, B.N., Khanadeev, V.A., Khlebtsov, N.G., 2008. Determination of the size, concentration, and

refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra. *Langmuir* **24**, 8964–8970. https://doi.org/10.1134/S0030400X08110143

Kim, D., Lee, S., Lee, M., Oh, J., Yang, S.-A., Park, Y., 2017. Refractive index as an intrinsic imaging contrast for 3-D label-free live cell imaging. *bioRxiv* 106328. https://doi.org/10.1101/106328

Kim, K., Choe, K., Park, I., Kim, P., Park, Y., 2016a. Holographic intravital microscopy for 2-D and 3-D imaging intact circulating blood cells in microcapillaries of live mice. *Sci. Rep.* **6**, 1–9. https://doi.org/10.1038/srep33084

Kim, K., Kim, K.S., Park, H., Ye, J.C., Park, Y., 2013a. Real-time visualization of 3-D dynamic microscopic objects using optical diffraction tomography. *Opt. Express* **21**, 32269. https://doi.org/10.1364/oe.21.032269

Kim, K., Yoon, H., Diez-Silva, M., Dao, M., Dasari, R.R., Park, Y., 2013b. High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography . *J. Biomed. Opt.* **19**, 011005. https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.1.011005

Kim, M.K., Ingremeau, F., Zhao, A., Bassler, B.L., Stone, H.A., 2016b. Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. *Nat. Microbiol.* **1**, 1–5. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.5

Kimkes, T.E.P., Heinemann, M., 2018. Reassessing the role of the Escherichia coli CpxAR system in sensing surface contact. *PLoS One* **13**, 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207181

Kitchens, C.L., Mcleod, M.C., Roberts, C.B., 2003. Solvent effects on the growth and steric stabilization of copper metallic nanoparticles in AOT reverse micelle systems 11331–11338. https://doi.org/10.1021/jp0354090

Korea, C.G., Badouraly, R., Prevost, M.C., Ghigo, J.M., Beloin, C., 2010. Escherichia coli K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ. Microbiol.* **12**, 1957–1977. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x

Lacroix-Gueu, P., Briandet, R., Lévêque-Fort, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fontaine-Aupart, M.P., 2005. In situ measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *Comptes Rendus - Biol.* **328**, 1065–1072. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2005.09.010

Le Brun, A.P., Clifton, L.A., Halbert, C.E., Lin, B., Meron, M., Holden, P.J., Lakey, J.H., Holt, S.A., 2013. Structural characterization of a model Gram-negative bacterial surface using lipopolysaccharides from rough strains of Escherichia coli. *Biomacromolecules* **14**, 2014–2022.

https://doi.org/10.1021/bm400356m

Lee, J., Kim, H., Cho, H., Jo, Y., Song, Y., Ahn, D., Lee, K., Park, Y., Ye, S.J., 2019. Deep-learning-based label-free segmentation of cell nuclei in time-lapse refractive index tomograms. *IEEE Access* **7**, 83449–83460. https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2924255

Lee, K., Kim, H.-D., Kim, K., Kim, Y., Hillman, T.R., Min, B., Park, Y., 2013a. Synthetic Fourier transform light scattering. *Opt. Express* **21**, 22453. https://doi.org/10.1364/oe.21.022453

Lee, K.R., Kim, K., Jung, J., Heo, J.H., Cho, S., Lee, S., Chang, G., Jo, Y.J., Park, H., Park, Y.K., 2013b. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: From principles to applications. *Sensors (Switzerland)* **13**, 4170–4191. https://doi.org/10.3390/s130404170

Li, N., Zeng, S., He, L., Zhong, W., 2010. Probing nanoparticle-protein interaction by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **82**, 7460–7466. https://doi.org/10.1021/ac101627p

Liang, Y., Hilal, N., Langston, P., Starov, V., 2007. Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **134–135**, 151–166. https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.003

Liu, J., Cao, D., Zhang, L., 2008. Molecular dynamics study on nanoparticle diffusion in polymer melts: A test of the Stokes-Einstein law. *J. Phys. Chem. C* **112**, 6653–6661. https://doi.org/10.1021/jp800474t

Liu, J., Prindle, A., Humphries, J., Gabalda-Sagarra, M., Asally, M., Lee, D.D., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J., Süel, G.M., 2015. Metabolic codependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* **523**, 550–554. https://doi.org/10.1038/nature14660

López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-González, D., 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interface Sci.* **283**, 344–351. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186

López-Viota, J., Mandal, S., Delgado, A. V., Toca-Herrera, J.L., Möller, M., Zanuttin, F., Balestrino, M., Krol, S., 2009. Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *J. Colloid Interface Sci.* **332**, 215–223. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.077

Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A., 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Transit. Met. Chem.* **105**, 14265–14270. https://doi.org/10.1023/A:1012006404144

Lyklema, J., 1991a. Fundamentals of interface and colloid science - Volume 1: Fundamentals.

Lyklema, J., 1991b. Fundamentals of interface and colloid science - Volume 2: Solid-liquid interfaces.

Lyklema, J., Leeuwen, H.P. Van, Minor, M., 1999. DLVO-theory, a dynamic re-interpretation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **83**, 33–69. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00011-1

Mah, T.F.C., O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2

Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A.B., 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci. Rep.* **6**, 1–11. https://doi.org/10.1038/srep38610

Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., Gottesman, S., 2005. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**, 6770–6778. https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6770-6778.2005

Malvern Instruments, 2013. Zetasizer Nano series user manualMAN0485.

Malvern Instruments Limited, 2012. A basic guide to particle characterization. *White Pap.* 1–26. https://doi.org/10.1021/ac00110a016

Manetti, A.G.O., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., Gambellini, G., Bensi, G., Mora, M., Edwards, A.M., Musser, J.M., Graviss, E.A., Telford, J.L., Grandi, G., Margarit, I., 2007. Streptococcus pyogenes pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **64**, 968–983. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05704.x

Martinez-Gil, M., Goh, K.G.K., Rackaityte, E., Sakamoto, C., Audrain, B., Moriel, D.G., Totsika, M., Ghigo, J.M., Schembri, M.A., Beloin, C., 2017. YeeJ is an inverse autotransporter from Escherichia coli that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation. *Sci. Rep.* **7**, 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10902-0

Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M.H., Cohen-Bouhacina, T., 2017. Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in Escherichia coli bacteria. *Adv. Colloid Interface Sci.* **245**, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.012

Mathelié-Guinlet, M., Grauby-Heywang, C., Martin, A., Février, H., Moroté, F., Vilquin, A., Béven, L., Delville, M.H., Cohen-Bouhacina, T., 2018. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of Escherichia coli, studied by AFM. *J. Colloid Interface Sci.* **529**, 53–

64. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.098

Maurya, S.K., Gopmandal, P.P., Ohshima, H., 2018. Electrophoresis of concentrated suspension of soft particles with volumetrically charged inner core. *Colloid Polym. Sci.* **296**, 721–732. https://doi.org/10.1007/s00396-018-4292-0

McNaught, A.D., Wilkinson, A., Nic, M., Jirat, J., Kosata, B., Jenkins, A., 2014. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd edition (the "Gold Book") 'Blackwell Scientific Publications. https://doi.org/https://doi.org/10.1351/goldbook

Merlin, J., 2012. Propriétés électrostatiques, mécaniques et chémodynamiques de (bio) interphases molles: analyses en régime d'équilibre et transitoire. Université de Lorraine.

Meyer, E.E., Rosenberg, K.J., Israelachvili, J., 2006. Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15739–15746. https://doi.org/10.1073/pnas.0606422103

Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science (80-.).* **307**, 538–544. https://doi.org/10.1126/science.1104274

Miyazaki, J., Kuriyama, Y., Miyamoto, A., Tokumoto, H., Konishi, Y., Nomura, T., 2014. Adhesion and internalization of functionalized polystyrene latex nanoparticles toward the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Adv. Powder Technol.* **25**, 1394–1397. https://doi.org/10.1016/j.apt.2014.06.014

Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 255–261. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00036-3

Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779–786. https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207

Monroe, D., 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **5**, e307. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059

Morrow, J.B., P., C.A., Holbrook, R.D., 2010. Association of quantum dot nanoparticles with biofilm. *J. Environ. Qual.* **39**, 1934. https://doi.org/10.2134/jeq2009.0455

Moussa, M., 2017. Loading of dendrimer nanoparticles into layer-by-layer assembled poly(diallyl dimethyl ammonium) chloride-(poly(acrylic acid))n multilayer films: Particle electrokinetics, film structure dynamics and elasticity. Université de Lorraine.

Moussa, M., Caillet, C., Town, R.M., Duval, J.F.L., 2015. Remarkable electrokinetic features of charge-stratified soft nanoparticles: Mobility reversal in monovalent aqueous electrolyte. *Langmuir* **31**, 5656–5666. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01241

Nair, S., Sasidharan, A., Divya Rani, V. V., Menon, D., Nair, S., Manzoor, K., Raina, S., 2009. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 235–241. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3548-5

Neal, A.L., 2008. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology* **17**, 362–371. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0217-x

Neal, A.L., Dublin, S.N., Taylor, J., Bates, D.J., Burns, J.L., Apkarian, R., DiChristina, T.J., 2007. Terminal electron acceptors influence the quantity and chemical composition of capsular exopolymers produced by anaerobically growing Shewanella spp. *Biomacromolecules* **8**, 166–174. https://doi.org/10.1021/bm060826e

Nevius, B.A., Chen, Y.P., Ferry, J.L., Decho, A.W., 2012. Surface-functionalization effects on uptake of fluorescent polystyrene nanoparticles by model biofilms. *Ecotoxicology* **21**, 2205–2213. https://doi.org/10.1007/s10646-012-0975-3

Nomura, T., Miyazaki, J., Miyamoto, A., Kuriyama, Y., Tokumoto, H., Konishi, Y., 2013. Exposure of the yeast saccharomyces cerevisiae to functionalized polystyrene latex nanoparticles: Influence of surface charge on toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 3417–3423. https://doi.org/10.1021/es400053x

O'Brien, R.W., White, L.R., 1978. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **74**, 1607–1626. https://doi.org/10.1039/F29787401607

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49–79. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49

O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**, 449–461. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x

Oh, Y.J., Jo, W., Yang, Y., Park, S., 2007. Influence of culture conditions on Escherichia coli O157:H7

biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **107**, 869–874. https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.01.021

Ohshima, H., 2000. On the general expression for the electrophoretic mobility of a soft particle. *J. Colloid Interface Sci.* **228**, 190–193. https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6942

Ohshima, H., 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **62**, 189–235. https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00279-Y

Okabe, S., Yasuda, T., Watanabe, Y., 1997. Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 459–469. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970305)53:5<459::AID-BIT3>3.0.CO;2-G

Oliver, S., Wagh, H., Liang, Y., Yang, S., Boyer, C., 2018. Enhancing the antimicrobial and antibiofilm effectiveness of silver nanoparticles prepared by green synthesis. *J. Mater. Chem. B* **6**, 4124–4138. https://doi.org/10.1039/c8tb00907d

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M., Biosca, E.G., 2010. Exopolysaccharides favor the survival of Erwinia amylovora under copper stress through different strategies. *Res. Microbiol.* **161**, 549–555. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.003

Otsu, N., 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.* **9**, 62–66. https://doi.org/10.1109/tsmc.1979.4310076

Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P., 2012. Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward Escherichia coli. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **92**, 315–321. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.12.012

Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2015. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **290**, 1712–1720. https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06

Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 577–588. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4

Park, S.-J., Seo, M.-K., 2011. Chapter 1 - Intermolecular forces. In 'Interface Science and Technology Volume 18'. pp. 1–57. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3

Parsek, M.R., Singh, P.K., 2003. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720

Paschkunova-Martic, I., Kremser, C., Mistlberger, K., Shcherbakova, N., Dietrich, H., Talasz, H., Zou, Y.,

Hugl, B., Galanski, M., Sölder, E., Pfaller, K., Höliner, I., Buchberger, W., Keppler, B., Debbage, P., 2005. Design, synthesis, physical and chemical characterisation, and biological interactions of lectin-targeted latex nanoparticles bearing Gd-DTPA chelates: An exploration of magnetic resonance molecular imaging (MRMI). *Histochem. Cell Biol.* **123**, 283–301. https://doi.org/10.1007/s00418-005-0780-7

Pericet-Camara, R., Papastavrou, G., Borkovec, M., 2009. Effective charge of adsorbed poly(amidoamine) dendrimers from direct force measurements. *Macromolecules* **42**, 1749–1758. https://doi.org/10.1021/ma802374z

Peulen, T.O., Wilkinson, K.J., 2011. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 3367–3373. https://doi.org/10.1021/es103450g

Pfreundschuh, M., Alsteens, D., Hilbert, M., Steinmetz, M.O., Müller, D.J., 2014. Localizing chemical groups while imaging single native proteins by high-resolution atomic force microscopy. *Nano Lett.* **14**, 2957–2964. https://doi.org/10.1021/nl5012905

Pham, M.T., Nguyen, T. Van, Vu Thi, T.D., Thi, H.L.N., Tong, K.T., Tran, T.T., Chu, V.H., Brochon, J.C., Tran, H.N., 2012. Synthesis, photophysical properties and application of dye doped water soluble silica-based nanoparticles to label bacteria E. coli O157:H7. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **3**. https://doi.org/10.1088/2043-6262/3/4/045013

Phillips, R.L., Miranda, O.R., You, C.C., Rotello, V.M., Bunz, U.H.F., 2008. Rapid and efficient identification of bacteria using gold-nanoparticle-poly(para-phenyleneethynylene) constructs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 2590–2594. https://doi.org/10.1002/anie.200703369

Pinaud, F., Michalet, X., Bentolila, L.A., Weiss, S., 2011. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* **27**, 1679–1687. https://doi.org/10.1038/jid.2010.15.Antagonistic

Planchon, M., Ferrari, R., Guyot, F., Gélabert, A., Menguy, N., Chanéac, C., Thill, A., Benedetti, M.F., Spalla, O., 2013. Interaction between Escherichia coli and TiO2 nanoparticles in natural and artificial waters. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 158–164. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.034

Popa, I., Papastavrou, G., Borkovec, M., 2010. Charge regulation effects on electrostatic patch-charge attraction induced by adsorbed dendrimers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4863–4871. https://doi.org/10.1039/b925812d

Pratt, L.A., Kolter, R., 1998. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: Roles of flagella,

motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**, 285–293. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x

Présent, R.M., 2018. Biodisponibilité et dynamique de partition de métaux traces aux interphases microbiennes : Effets de complexation intracellulaire et application aux biosenseurs bactériens.

Présent, R.M., Rotureau, E., Billard, P., Pagnout, C., Sohm, B., Flayac, J., Gley, R., Pinheiro, J.P., Duval, J.F.L., 2017. Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 29114–29124. https://doi.org/10.1039/c7cp05456d

Radzig, M.A., Nadtochenko, V.A., Koksharova, O.A., Kiwi, J., Lipasova, V.A., Khmel, I.A., 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 300–306. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039

Ramalingam, B., Parandhaman, T., Das, S.K., 2016. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of Gram-negative bacteria viz. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 4963–4976. https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161

Reisner, A., Haagensen, J.A.J., Schembri, M.A., Zechner, E.L., Molin, S., 2003. Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**, 933–946. https://doi.org/3490 [pii]

Ribeiro, T., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2017. Artefact-free evaluation of metal enhanced fluorescence in silica coated gold nanoparticles. *Sci. Rep.* **7**, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02678-0

Ribeiro, T., Raja, S., Rodrigues, A.S., Fernandes, F., Baleizão, C., Farinha, J.P.S., 2014. NIR and visible perylenediimide-silica nanoparticles for laser scanning bioimaging. *Dye. Pigment.* **110**, 227–234. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.03.026

Ricaud, M., Witschger, O., 2012. Nanomaterials. *INRS*.

Rizvi, S.B., Ghaderi, S., Keshtgar, M., Seifalian, A.M., 2010. Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging . *Nano Rev.* **1**, 5161. https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5161

Sadrearhami, Z., Shafiee, F.N., Ho, K.K.K., Kumar, N., Krasowska, M., Blencowe, A., Wong, E.H.H., Boyer, C., 2019. Antibiofilm nitric oxide-releasing polydopamine coatings. *ACS Appl. Mater. Interfaces*

11, 7320–7329. https://doi.org/10.1021/acsami.8b16853

SAFAS Monaco, 2015. Spectrofluorimètres SAFAS FLX-Xenius.

Satake, M., Hayashi, Y., Mido, Y., Iqbal, S.A., Sethi, M.S., 1996. Colloidal and surface chemistry, Discovery. ed.

Shahriari, S., Monajjemi, M., Zare, K., 2018. Increasing the efficiency of some antibiotics on penetrating bacteria cell membrane. *Ukr. J. Ecol.* **8**, 671–679. https://doi.org/10.15421/2018

Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U., 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *J. Nanobiotechnology* **12**, 1–11. https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5

Shaw, T., Winston, M., Rupp, C.J., Klapper, I., Stoodley, P., 2004. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 1–4. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.098102

Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T., Wang, W., 2006. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials* **27**, 2440–2449. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.036

Shimomura, O., 1979. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**, 220–222. https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80818-2

Silva, T., Pokhrel, L.R., Dubey, B., Tolaymat, T.M., Maier, K.J., Liu, X., 2014. Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Sci. Total Environ.* **468–469**, 968–976. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.006

Simon-Deckers, A., Loo, S., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Menguy, N., Reynaud, C., Gouget, B., Carriere, M., 2009. Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 8423–8429. https://doi.org/10.1021/es9016975

Singh, G., Joyce, E.M., Beddow, J., Mason, T.J., 2012. Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2**, 106–120.

Škvarla, J., 2007. Hard versus soft particle electrokinetics of silica colloids. *Langmuir* **23**, 5305–5314. https://doi.org/10.1021/la0635451

Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., Nie, S., 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1226–1240. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **275**, 177–182. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012

Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H., Kondo, T., 1995. Difference in surface properties between Escherichia coli and Staphylococcus aureus as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys. Chemisrty* **55**, 273–277. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00004-H

Stelzer, E.H.K., 2002. Beyond the diffraction limit? *Nature* **417**, 806–807.

Stephens, D.J., Allan, V.J., 2003. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science (80-.).* **300**, 82–86. https://doi.org/10.1126/science.1082160

Stern, O., 1924. Zur Theorie der elektrolytischen Doppelsicht. *Zeitschrift für Elektrochemie* **30**, 508–516. https://doi.org/https://doi-org.fr/10.1002/bbpc.192400182

Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* **185**, 1485–1491. https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485

Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Lancet* **358**, 135–138. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 199–210. https://doi.org/10.1038/nrmicro1838

Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69. https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5

Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L., Klabunde, K.J., 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* **18**, 6679–6686. https://doi.org/10.1021/la0202374

Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of Pseudomonas aeruginosa. *J. Microbiol. Methods* **50**, 237–248.

Sullivan, S.M., Holyoak, T., 2008. Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13829–13834. https://doi.org/10.1073/pnas.0805364105

Svenson, S., 2009. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 445–462. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.023

Taheri-Araghi, S., Bradde, S., Sauls, J.T., Hill, N.S., Levin, P.A., Paulsson, J., Vergassola, M., Jun, S., 2015. Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr. Biol.* **25**, 385–391. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.009

Tan, W., Wang, K., He, X., Zhao, X.J., Drake, T., Wang, L., Bagwe, R.P., 2004. Bionanotechnology Based on Silica Nanoparticles **24**, 621–638. https://doi.org/10.1002/med.20003

Terry J. Beveridge, 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733.

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO2 nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6151–6156. https://doi.org/10.1021/es060999b

Tran, H.N., Nghiem, T.H.L., Duong Vu, T.T., Pham, M.T., Nguyen, T. Van, Tran, T.T., Chu, V.H., Tong, K.T., Tran, T.T., Xuan Le, T.T., Brochon, J.C., Nguyen, T.Q., Hoang, M.N., Duong, C.N., Nguyen, T.T., Hoang, A.T., Nguyen, P.H., 2013. Dye-doped silica-based nanoparticles for bioapplications. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **4**. https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/4/043001

Tripathi, S.M., Bock, W.J., Mikulic, P., Chinnappan, R., Ng, A., Tolba, M., Zourob, M., 2012. Long period grating based biosensor for the detection of Escherichia coli bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 308–312. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.006

Trunk, T., S. Khalil, H., C. Leo, J., 2018. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* **4**, 140–164. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140

Tseng, S., Huang, C.H., Hsu, J.P., 2015. Electrophoresis of two spheres: Influence of double layer and van der Waals interactions. *J. Colloid Interface Sci.* **451**, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.060

Tsien, R.Y., 2018. The Green Fluorescent Protein (GFP). *Bangkok Med. J.* **05**, 101–102. https://doi.org/10.31524/bkkmedj.2013.02.020

Valle-Delgado, J.J., Molina-Bolívar, J.A., Galisteo-González, F., Gálvez-Ruiz, M.J., Feiler, A., Rutland, M.W., 2005. Hydration forces between silica surfaces: Experimental data and predictions from different theories. *J. Chem. Phys.* **123**. https://doi.org/10.1063/1.1954747

Van Der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A.J.B., Lyklema, J., 1997. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **9**, 81–100. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(96)01340-9

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B., 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1898–1901. https://doi.org/0099-2240/87/081898-04$02.00/0

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**, 75–87.

Verano-Braga, T., Miethling-Graff, R., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Brewer, J.R., Erdmann, H., Kjeldsen, F., 2014. Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics. *ACS Nano* **8**, 2161–2175. https://doi.org/10.1021/nn4050744

Verwey, E.J.W., Overbeek, J.T.G., 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids. Elsevier Publishing Company, INC. https://doi.org/10.1002/pol.1949.120040321

Vidakovic, L., Singh, P.K., Hartmann, R., Nadell, C.D., Drescher, K., 2017. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat. Microbiol.* **3**, 26–31. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0050-1

Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejeune, P., 1998. Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**, 2442–2449.

Vidic, J., 2013. Nanoparticules pour des applications antibactériennes, antifongiques et antivirales. *Tech. l'ingénieur* **33**.

Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Jiang, T., Wang, S., 2015. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 313–327. https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014

Wang, Y.A., Yu, X., Silverman, P.M., Harris, R.L., Egelman, E.H., 2009. The structure of F-pili. *J. Mol. Biol.* **385**, 22–29. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.054

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Von Goetz, N., 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2242–2250. https://doi.org/10.1021/es204168d.

Whitfield, G.B., Marmont, L.S., Howell, P.L., 2015. Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Front. Microbiol.* **6**, 1–21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00596

Yang, C., Xie, H., Li, Q.C., Sun, E.J., Su, B.L., 2015. Adherence and interaction of cationic quantum dots

on bacterial surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **450**, 388–395. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.041

Yang, Y., Heine, R., Xu, F., Suhonen, H., Helfen, L., Rosenhahn, A., Gorniak, T., Kirchen, S., Schwartz, T., Baumbach, T., 2013a. Correlative imaging of structural and elemental composition of bacterial Biofilms. *J. Phys. Conf. Ser.* **463**, 15–19. https://doi.org/10.1088/1742-6596/463/1/012053

Yang, Y., Quensen, J., Mathieu, J., Wang, Q., Wang, J., Li, M., Tiedje, J.M., Alvarez, P.J.J., 2013b. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag+ on the microbial community structure of activated sludge. *Water Res.* **48**, 317–325. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.046

Yerly, J., Hu, Y., Jones, S.M., Martinuzzi, R.J., 2007. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images. *J. Microbiol. Methods* **70**, 424–433. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.022

Yoon, J., Jo, Y.J., Kim, M.H., Kim, K., Lee, S.Y., Kang, S.J., Park, Y.K., 2017. Identification of non-activated lymphocytes using three-dimensional refractive index tomography and machine learning. *Sci. Rep.* **7**, 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06311-y

Yoon, J., Kim, K., Park, H., Choi, C., Jang, S., Park, Y., 2015. Label-free characterization of white blood cells by measuring 3D refractive index maps. *Biomed. Opt. Express* **6**, 3865. https://doi.org/10.1364/boe.6.003865

Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L., Wagner, S., Büchel, C., von Briesen, H., Kreuter, J., 2009. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J. Control. Release* **137**, 78–86. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.002

Zeyons, O., Thill, A., Chauvat, F., Menguy, N., Cassier-Chauvat, C., Oréar, C., Daraspe, J., Auffan, M., Rose, J., Spalla, O., 2009. Direct and indirect CeO2 nanoparticles toxicity for Escherichia coli and Synechocystis. *Nanotoxicology* **3**, 284–295. https://doi.org/10.3109/17435390903305260

Zhang, J., Hu, J., 2008. Image segmentation based on 2D Otsu method with histogram analysis. In 'International Conference on Computer Science and Software Engineering, CSSE 2008'. pp. 105–108. https://doi.org/10.1109/CSSE.2008.206

Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., Crittenden, J., 2009. Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Res.* **43**, 4249–4257. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.005

Zhang, Z., Nadezhina, E., Wilkinson, K.J., 2011. Quantifying diffusion in a biofilm of Streptococcus mutans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1075–1081. https://doi.org/10.1128/aac.01329-10

Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K., Elings, V.B., 1993. Fractured polymer / silica fiber surface studied by tapping mode AFM. *Surf. Sci.* **290**, L688–L692.

Effets de nanoparticules de silice sur la physicochimie de surface de bactéries planctoniques et sur l'architecture des biofilms : analyse par électrophorèse et holotomographie.

Résumé :

La dissémination de nanoparticules (NPs) manufacturées dans l'environnement entraine de profondes répercussions sur les équilibres physico-chimiques des milieux aquatiques. Afin de comprendre ces répercussions, il est essentiel d'analyser, entre autres choses, les mécanismes d'interactions des NPs avec le compartiment biotique des écosystèmes, en particulier avec les bactéries à l'état planctonique ou organisées en un consortium appelé biofilm. Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont été consacrés à la compréhension des interactions physico-chimiques entre des NPs de silice présentant une surface fonctionnalisée par des groupements terminaux -NH_2 ou -COOH, et plusieurs mutants d'un système modèle bactérien (*Escherichia coli*) arborant de manière sélective différents types d'appendices de surface (protéines adhésives de type YeeJ ou filaments protéiques pili-F). L'utilisation de l'électrophorèse appliquée à des suspensions binaires bactéries-NPs a permis de détecter (i) les signatures électrostatiques des premiers stades d'interactions, (ii) les changements des caractéristiques électro-hydrodynamiques des bactéries et des NPs dus aux modifications de la surface des bactéries et à l'acquisition de bio-couronne par les NPs suite au relargage de composés cellulaires, et (iii) une forte dépendance des propriétés électrocinétiques des cellules et nanoparticules à la concentration en NPs et au pH de la solution, et ce, en fonction de la nature des biostructures pariétales. La microscopie à force atomique a permis d'évaluer la morphologie des cellules selon leurs conditions d'exposition aux NPs, ainsi que leur rugosité de surface, ces résultats corroborant les conclusions dérivées des études électrocinétiques. Le deuxième volet de cette thèse, plus exploratoire, concerne l'analyse, par une technique d'imagerie 3D sans marquage (holotomographie) de la structure de biofilms bactériens générés en présence de NPs. Une méthode d'exploitation des données holotomographiques est proposée pour la détermination de différents proxys caractérisant la structure du biofilm, en particulier son épaisseur, son profil de densité, ou l'identification de 'cheminées' à l'interface biofilm/solution. Les capacités de la méthode à discerner ces identifiants physico-chimiques ont été testées sur un biofilm généré à partir de bactéries décorées de protéines YeeJ. L'impact des NPs de silice sur la structure de ce biofilm a alors été discuté en fonction de la nature de leurs groupements fonctionnels de surface (-NH_2 ou -COOH).

Mots clés : Interaction électrostatique – Biofilm – Nanoparticules – Electrophorèse – Microscopie à Force Atomique – Holotomographie.

Effects of silica nanoparticles on the physicochemical surface properties of planktonic bacteria and on the architecture of biofilms: analysis by electrophoresis and holotomography.

Abstract:

The release of manufactured nanoparticles (NPs) into the environment has profound repercussions on the physico-chemical equilibria operating in natural aquatic media. In order to appreciate these repercussions, it is critical to address, among other things, the interaction mechanisms between NPs and the biotic compartment of ecosystems, in particular bacteria in planktonic state or organized in a biofilm. In this context, this thesis work was devoted to the understanding of the physico-chemical interactions between silica nanoparticles with -NH_2 or -COOH functionalized surface, and several mutants of a bacterial model system (*Escherichia coli*) selectively displaying different types of surface appendages at their periphery (YeeJ adhesive proteins or pili-F protein filaments). The use of electrophoresis applied to bacteria-NPs binary suspensions made it possible to detect (i) the electrostatic signatures of the first stages of interactions, (ii) the changes in the electro-hydrodynamic characteristics of both bacteria and NPs due to membrane damage and acquisition of bio-corona by NPs following the release of cellular compounds, and (iii) the strong dependence of the electrokinetic properties of both cells and nanoparticles on the nature of the parietal biostructure, on NPs concentration and on solution pH. The use of atomic force microscopy further allowed the evaluation of cells morphology depending on cells exposure conditions, as well as their surface roughness, these results corroborating the conclusions derived from electrokinetic study. The second part of this thesis, exploratory in nature, concerns the analysis by a 3D imaging technique (holotomography, no sample labelling required) of the structure of bacterial biofilms generated in the presence of NPs. A method for exploiting holotomographic data is proposed and leads to the determination of different proxies characterizing the structure of the biofilm, in particular its thickness, its density profile, or the identification of 'chimneys' at the biofilm/solution interface. The capabilities of the method to evaluate these physicochemical fingerprints are tested on a biofilm generated from bacteria decorated with YeeJ proteins. The impacts of silica nanoparticles on the structure of this biofilm are then discussed according to the nature of their functional surface groups (-NH_2 or -COOH).

Keywords: Electrostatic interaction – Biofilm – Nanoparticles – Electrophoresis – Atomic Force Microscopy – Holotomography.