



**HAL**  
open science

# Effets bactéricides des nanoparticules d'oxydes métalliques

Christophe Pagnout

► **To cite this version:**

Christophe Pagnout. Effets bactéricides des nanoparticules d'oxydes métalliques. Sciences de l'environnement. Université de Lorraine, 2021. tel-03110829

**HAL Id: tel-03110829**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03110829>**

Submitted on 14 Jan 2021

**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.



Mémoire présenté par

**Christophe PAGNOUT**

En vue de l'obtention de l'

**Habilitation à Diriger des Recherches**

Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

**Université de Lorraine**

**Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles (SIRENa)**

**Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)**

**UMR CNRS 7360**

# **Effets bactéricides des nanoparticules d'oxydes métalliques**

Travaux présentés le 12 janvier 2021

**Devant le jury composé de :**

|                        |   |                   |
|------------------------|---|-------------------|
| Touria COHEN BOUHACINA | PR Univ. Bordeaux – Lab. LOMA               | <b>Rapporteur</b> |
| Catherine SANTAELLA    | CR CNRS – LEMIRE – Univ. Aix-Marseille      | <b>Rapporteur</b> |
| Frédéric BARRAS        | PR Institut Pasteur – Paris                 | <b>Rapporteur</b> |
| Agnès RICHAUME-JOLION  | PR Univ. Lyon 1 – Lab. Ecologie Microbienne | <b>Examineur</b>  |
| Jérôme DUVAL           | DR CNRS – LIEC Nancy                        | <b>Examineur</b>  |
| Pascale BAUDA          | PR Univ. Lorraine – LIEC Metz               | <b>Examineur</b>  |



# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Curriculum vitae</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. Etat civil.....   | 1         |
| 1.2. Cours universitaire - Qualifications .....  | 1         |
| 1.3. Parcours professionnel .....  | 2         |
| 1.4. Activité d'enseignement et responsabilités .....  | 2         |
| 1.5. Activités de recherche.....   | 3         |
| 1.5.1. Bilan des activités de recherche .....  | 3         |
| 1.5.2. Participation à des contrats et programmes de recherche .....                                   | 4         |
| 1.5.3. Animation et administration de la recherche .....   | 5         |
| 1.5.4. Encadrement de masters, thèses et post-doctorats .....  | 6         |
| 1.6. Liste des publications et communications scientifiques .....                                      | 8         |
| 1.6.1. Publications internationales dans des revues à comité de lecture .....                          | 8         |
| 1.6.2. Chapitre d'ouvrage .....  | 10        |
| 1.6.3. Communications orales (* invité) (>2009) .....  | 10        |
| 1.6.4. Communications affichées >2009 .....  | 13        |
| 1.6.5. Communications grand public.....  | 15        |
| <b>2. Synthèse des activités de recherche</b> .....  | <b>17</b> |
| 2.1. Préambule .....   | 17        |
| 2.2. Contexte - <i>Effets bactéricides des particules nanométriques</i> .....                          | 18        |
| 2.3. Synthèse des activités .....  | 23        |
| 2.3.1. <i>Rôle des interactions électrostatiques dans la (géo)toxicité des NP sur les bactéries...</i> | 23        |
| 2.3.2. <i>Mécanismes d'action des NP sur les bactéries</i> .....                                       | 27        |
| 2.3.3. <i>Rôle de l'interphase bactérienne dans la toxicité des NP</i> .....                           | 32        |
| 2.3.4. <i>Effets des NP à l'échelle de la communauté bactérienne</i> .....                             | 38        |
| 2.3.5. <i>La luminescence bactérienne comme système rapporteur de l'expression des gènes ...</i>       | 46        |
| <b>3. Projet scientifique</b> .....  | <b>49</b> |
| 3.1. Cadre conceptuel .....  | 49        |
| 3.2. Cadre opérationnel .....  | 53        |
| 3.2.1. <i>La microscopie confocale comme outil d'étude mécanistique</i> .....                          | 53        |
| 3.2.2. <i>La bioluminescence bactérienne comme proxy de toxicité</i> .....                             | 55        |
| 3.2.3. <i>La vésiculation comme mécanisme de résistance bactérien</i> .....                            | 57        |
| 3.2.4. <i>Nanocosme microbien comme outil de diagnostic</i> .....                                      | 58        |
| <b>Références</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>ANNEXE 1</b> .....  | <b>66</b> |



# 1. Curriculum vitae

## 1.1. Etat civil

---

### Christophe PAGNOUT

Né le 30/09/1978 à Limoges (87), 42 ans

Marié, 2 enfants

#### Adresse personnelle :

6 rue Maurice Ravel

57310 Bousse

Tel. 06.31.64.42.55

#### Adresse professionnelle :

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)

CNRS UMR 7360, Université de Lorraine

Campus Bridoux

8, rue du Général Delestraint

57070 Metz – France

Tel. 03.87.37.86.57

Fax. 03.87.37.86.12

Email : christophe.pagnout@univ-lorraine.fr

## 1.2. Cours universitaire - Qualifications

---

**2006** : Qualifié sections CNU 64, 65, 67, 68

**2005** : Doctorat en Génie Génétique et Microbiologie, Mention très honorable

Université Paul Verlaine de Metz

Laboratoire Ecotoxicité Santé Environnemental (ESE), CNRS UMR 7146, Metz

*Titre* : Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par *Mycobacterium* sp. SNP11.

Thèse soutenue le 1<sup>er</sup> décembre 2005 à Metz devant le jury constitué de :

|                      |                               |                       |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Nelly COCHET         | Univ. de Compiègne            | Rapporteur            |
| Dirk SPRINGAEL       | Univ. de Louvain (B)          | Rapporteur            |
| Corinne LEYVAL       | Fac. des Sciences, Vandoeuvre | Examineur             |
| Henry-Michel CAUCHIE | Centre Gabriel Lippmann (LU)  | Examineur             |
| Jean-François FERARD | Univ. Paul Verlaine, Metz     | Directeur de thèse    |
| Pascal POUPIN        | Univ. Paul Verlaine, Metz     | Co-directeur de thèse |

**2002** : DEA en Écotoxicologie et Biologie Moléculaire - Université Paul Verlaine de Metz.

**2001** : Maîtrise en Biochimie, Biologie moléculaire - Faculté des Sciences de Limoges.

**2000** : Licence en Biochimie, Biologie moléculaire - Faculté des Sciences de Limoges

**1999** : DEUG Sciences et Vie de la Terre - Faculté des Sciences de Limoges

**1997** : Baccalauréat série S - Lycée Les Vaseix, Limoges

### 1.3. Parcours professionnel

---

**Depuis septembre 2007 :**

Maître de Conférences – Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) – CNRS UMR 7360

**Septembre 2006 – Septembre 2007 :**

Postdoctorat – Rutgers University (USA), Laboratoires de G. Zylstra et J. Kukor  
*Sujet* : Biodégradation des Polychlorobiphényles par les bactéries.

**Septembre 2005 - Septembre 2006 :**

Attaché Temporaire d'Etude et de Recherche (ATER)  
IUT Yutz/Thionville, Laboratoire Ecotoxicité Santé Environnemental (ESE), CNRS UMR 7146  
*Sujet* : Etude et caractérisation d'un consortium bactérien intervenant dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

**Septembre 2002 - Décembre 2005 :**

Doctorat en Génie Génétique et Microbiologie, Mention très honorable  
Université Paul Verlaine de Metz  
Laboratoire Ecotoxicité Santé Environnemental (ESE), CNRS UMR 7146, Metz  
*Sujet* : Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par *Mycobacterium* sp. SNP11.

### 1.4. Activité d'enseignement et responsabilités

---

Depuis mon recrutement en septembre 2007, mon service d'enseignement est compris entre 210 et 240 heures équivalent TD (variable en fonction du nombre de groupes TD/TP). La majorité des enseignements étant réalisés en 3<sup>ème</sup> année de Licence et 1<sup>ère</sup> année de Master.

**Service effectué sur l'année universitaire 2019-2020 :**

**Licence SV 1ère année :**

Introductions aux Sciences de l'Environnement : 2h CM ; 4h TD x 5gr  
Projet professionnel : 12h TP x1gr  
Enseignant référent : 6h TP

**Licence SV 2ème année :**

Introduction à l'écotoxicité : 2h CM ; 4h TD x 1gr  
UE Libre : Les OGM, enjeux et risques pour l'environnement (3h CM)  
Les nanoparticules, enjeux et risques pour l'environnement (6h CM)

**Licence SV 3ème année :**

Ecophysiologie microbienne (responsable de l'UE) (Parcours MCO) : 16h CM ; 4h TD ; 10h TP x 2gr  
Génie microbiologique (Parcours MCO) : 12h TP x 2gr  
Ecologie microbienne (Parcours SE) : 3h TD ; 9h TP x 1gr  
Les biocapteurs bactériens (L3 pro AQI): 2h TD x 2gr ; 8h TP x 2gr  
Projet professionnel (Parcours MCO + SE): 5h TD x1gr  
Tuteur pédagogique stage et TER (Parcours MCO + SE) : 10h TD (5 étudiants)

**Master 1ère année :**

Traitements biologiques des sols et de l'eau (Spé. GE) : 12h CM ; 2h TD ; 12h TP x 2gr

Ecologie microbienne (Spé. E2SA) : 2h TD ; 12h TP x 1gr

Outils analytiques et moléculaires (Spé. E2SA) : 2h CM ; 8h TP x1gr

Traitement des effluents liquides (Spé. GE) : 5h TP (visites d'entreprises)

Traitement des déchets solides (Spé. GE) : 6h TP (visites d'entreprises)

**Master 2<sup>ème</sup> année :**

Ecotoxicologie microbienne (Masters Angers et Le Mans) : 2h CM

-----

**Responsable du parcours Molécules, Cellules, Organismes (MCO)** de La Licence Sciences de la Vie (L3) de l'université de Lorraine depuis 2013.

**Membre de la commission pédagogique de l'UFR SciFA – Université de Lorraine** depuis 2015.

**Membre du conseil de formation de la licence Science de la Vie Metz/Nancy - Université de Lorraine** depuis 2013.

**Responsable de l'unité d'enseignement** Microbiologie (UF604M1 – 60 heures - L3 MCO) constitué des EC Ecophysiologie Microbienne et Génie Microbiologique.

**Autres missions pédagogiques :**

Participation à la fête de la Science de 2015 à 2019 (mise en place et coordination d'un atelier pédagogique)

Participation au forum *ORIENTATION* en 2013 à 2019 (tenue d'un stand et présentation de la licence SV), *Cap sur le Sup* 2016 à 2019 (présentation orale de l'offre de formation en Licence) et dans différents lycées de la région.

## **1.5. Activités de recherche**

---

### **1.5.1. Bilan des activités de recherche**

*Thématique de recherche* : **Écotoxicologie Microbienne**

- Etude des mécanismes de toxicité et de résistance des bactéries aux métaux, métalloïdes et nanoparticules aux échelles moléculaires, cellulaires et populationnelles.
- Évaluation de l'impact de stress anthropiques sur la diversité microbienne et les processus fonctionnels associés.

*Bilan bibliométrique* (Données Google Scholar au 11/11/20) :

Nombre total de publications : 29

H-index : 18

Nombre total de citations : 820

Participation à de nombreuses communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux : 25 communications orales dont 19 internationales (2 conférences invitées), 22 communications affichées

### **1.5.2. Participation à des contrats et programmes de recherche**

**2021-2024 : ANR.** Assessing the molecular mechanisms behind nanoparticles toxicity towards microalgae (ANATOMIC). *Coordinateur* : A. Beaussart.

**2020-2021 : Projet OTELO.** Evaluation de la biodisponibilité et de la toxicité de contaminants par le décodage mécanistique de la réponse temporelle de biosenseurs bactériens luminescents répondant au Cd. *Coordinateur* : JFL Duval & C. Pagnout.

**2018-2020 : Projet EC2CO (ECODYN).** Mieux évaluer la biodisponibilité des métaux traces dans des bio-assemblages par l'analyse couplée des réponses de senseurs bactériens et électroanalytiques (DISPEL). *Coordinateur*: E. Rotureau

**2016-2018 : Projet Région Grand Est.** Effets des filtres solaires nanoparticulaires (ZnO) sur un réseau trophique microbien modèle (20 K€). *Coordinateur*: C. Pagnout

**2016-2018 : Projet ROVALTIN.** Evaluation of molecular and interfacial biophysical endpoints for nanoparticles toxicity toward bacteria (EVAMINTOX). *Coordinateur*: JFL Duval

**2016-2018 : Projet EC2CO (ECODYN/MICROBIEN).** Evaluations de la toxicité de nanovecteurs thérapeutiques pour cyanobactérie modèle aux échelles moléculaire, interfaciale et populationnelle (NanoOtherScale). *Coordinateur*: JFL Duval

**2015-2016 : Projet OTELO.** Réactivité et transfert dynamique de contaminants métalliques aux interfaces microbiennes : approche de dynamique de partition. *Coordinateurs* : C. Pagnout & E. Rotureau.

**2013-2016 : ANR CESA NanoSalt.** Nanomaterials from freshwater to seawater: ecotoxicological effects within a life cycle perspective. *Coordinatrice* : M. Auffan (Cerege).

**2013-2014 : Projet PEPS PeRSoNa .** Nanotechnologies, Risk Perception, Social and Human Sciences: an opened field to transdisciplinarity. *Coordinatrice* : J. Lighezzolo-Alnot.

**2012-2013 : Projet OTELO.** Impact des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur les propriétés biophysico-chimiques de l'interphase bactérienne. *Coordinateurs* : C. Pagnout & JFL Duval.

**2011-2014 : ANR P2N.** Mesocosm network for Environmental Nanotechnology Risk Assessment (Mesonnet). *Coordinateur* : J.-Y. Bottero (Cerege).

**2009-2010 : Projet FR-EST.** Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> en milieu aqueux: comportement colloïdal et impact sur les communautés bactériennes. *Coordinateur* : C. Pagnout.

**2008-2011 : ANR CES.** Environmental Hazard assessment of Residues from the Degradation of commercialized Nanomaterials: Fate, biotransformation and toxicity towards living organisms from aquatic media (AgingNano&Troph). *Coordinateur* : J. Rose (Cerege).

**2008-2011 : ANR Biodiversity.** Liming of forested catchments and biodiversity restoration (RECOVER). *Coordinateur*: F. Guérol (LIEC).

**2008-2010 : EC2CO CYTRIX.** Ecotoxicité des sous-produits d'altération des nanomatériaux (NanoAlter). *Coordinateur* : J. Rose (Cerege).

### **1.5.3. Animation et administration de la recherche**

*Membre élu au Conseil de Laboratoire du LIEC depuis 2018.*

#### *Groupements de recherche internationaux :*

- 2013-2017. Membre du comité de gestion de l'action COST ENTER 1205. *Transfer of engineered nanomaterials from wastewater treatment & stormwater to rivers. Coordinateur :* Lars Duester (BfG Koblenz, Allemagne). Co-responsable Français
- 2013-2017. Co-responsable et co-coordonateur Français (en binôme avec Yann Sivry – IPGP Paris) de l'action COST ENTER 1205. *Transfer of engineered nanomaterials from wastewater treatment & stormwater to rivers.* 28 pays impliqués / 160 membres.
- Depuis 2009, membre du GDRi International Consortium for the Environmental Implications of Nano Technology (GDR - iCEINT). *Coordinateur :* Jean-Yves Bottero (Cerege, Aix en Provence).

#### *Organisation de manifestations scientifiques :*

- Membre du comité scientifique congrès Interface Against Pollution (IAP), Juin 2012 Nancy.
- Membre du comité d'organisation et du comité scientifique du congrès COST action ES1205, Février 2017, Aveiro, Portugal.

#### *Jurys de recrutement de Maître de Conférences :*

- Poste MC 0268 pour l'ENSAT, Toulouse, Section CNU 68, Mai 2013 (Membre externe).
- Poste MC 0644 pour le LIEC, Metz, Section CNU 67, Avril 2014 (Membre interne).
- Poste MC 1094 pour le LIEC, Metz, Section CNU 67, Mai 2018 (Membre interne).

#### *Comités de sélection des ATER :*

- 2020-2021. Section 67 – 1 poste, Biologie animale
- 2020-2021. Section 67 – 1 poste, Biologie végétale
- 2019-2020. Section 67 - 2 demi-postes, Ecologie et biologie des organismes
- 2018-2019. Section 67 - 2 demi-postes, Ecologie et biologie des organismes

#### *Comités de pilotage :*

- Septembre 2017 : Comité de pilotage Thèse Claudia WATANABE. Directeur de thèse Marc Benedetti (IPGP - Sorbonne Paris Cité - Univ. Paris Diderot UMR CNRS 7154). *Sujet :* Transport, availability and ecotoxicology of nanoparticles in the environment: interactions with natural organic matter in aquatic systems.

#### *Jurys de thèse :*

- William DUDEFOI (INRA, BIA-ISD, Nantes), Mars 2017  
Membres de jury : Marie-Hélène Ropers (Dir), Bernard Humbert (co-dir), Hélène Térissé (co-dir), Paul Westrhoff (Rapporteur), Muriel Mercier-Bonin (Rapporteur), Christophe Pagnout (Membre invité), Nicolas Feltin (Membre invité).  
*Titre :* Le dioxyde de titane en alimentation : caractérisation, devenir dans les fluides digestifs et impact sur le microbiote intestinal humain.
- Romain PRESENT (LIEC, Université de Lorraine), Juin 2018  
Membres de jury : Jerome Duval (Dir), Elise Rotureau (co-dir), Christel HASSLER (Rapporteur), Pierre LABADIE (Rapporteur), Gérald THOUAND (Examineur) Patrick Billard (examineur), Christophe Pagnout (Membre invité).  
*Titre :* Biodisponibilité et Dynamique de Partition de Métaux Traces aux Interphases Microbiennes: Effets de Complexation Intracellulaire et Application aux Biosenseurs Bactériens.

*Expertises de projets et revues scientifiques :*

- Expertise de projets ANSES 2014, 2015, 2018.
- Référé occasionnel pour *Journal of Hazardous Materials, Toxicology Letters, Nanotoxicology* et *Colloids and Surfaces B*.

**1.5.4. Encadrement de masters, thèses et post-doctorats**

Postdoctorat :

**2009 – 2010** : Mandeep DADHWAL – Encadrement 100% - Financement ANR CES AgingNano&Troph (18 mois). *Sujet* : Etudes des effets écotoxicologiques des sous-produits d'altération de nanomatériaux sur les bactéries.

Thèses :

**1/2020 – 2023** : Eva DELATOUR - 50% co-direction avec Jérôme DUVAL - Bourse MENRT

*Titre de la thèse* : Biosenseurs bactériens pour la détection de métaux traces : mesurer et formaliser la spéciation et la toxicité des espèces métalliques via la bioluminescence bactérienne.

**10/2015 – 07/2019** : Anne VICENTE - 50% co-direction avec Pascale BAUDA - Bourse MENRT

*Titre de la thèse* : Effets des filtres solaires nanoparticulaires sur un réseau trophique microbien modèle

**05/2011 – 07/2014** : Stéphane JOMINI - 50% co-direction avec Pascale BAUDA – Bourse Univ.

*Titre de la thèse* : Effets des nanoparticules d'oxydes métalliques sur les bactéries, de la cellule à l'écosystème.

**10/2008 – 11/2012** : Audré CORDI - 50% co-direction avec Pascale BAUDA – Bourse MENRT

*Titre de la thèse* : Métabolisme procaryotes de l'arsenic dans les sédiments en aval d'un site minier.

**10/2008 – 11/2012** : Hugues CLIVOT - 50% co-direction avec François Guerold – ANR Recover

*Titre de la thèse* : Acidification et restauration d'écosystèmes forestiers : effets sur les communautés microbiennes et sur les processus fonctionnels associés.

Masters 2 :

**10/2018 – 05/2019** : Yoann Menard (M2 ETOX, Metz) - Encadrement 100%

*Sujet* : Utilisation de la microscopie hyperspectrale pour la localisation des nanoparticules dans le (micro)organismes.

**01/2018 – 07/2018** : Yoann Menard (M2 Écotoxicologie et Chimie de l'Environnement, Bordeaux) - Encadrement 100%

*Sujet* : Utilisation de la microscopie hyperspectrale pour la localisation des nanoparticules dans le (micro)organismes.

**01/2017 – 07/2017** : Eva DELATOUR (M2 Toxicologie de l'Environnement, Angers) - Encadrement 100%

*Sujet* : Evaluation of molecular and interfacial biophysical endpoints for nanoparticles toxicity toward bacteria. Projet Rovaltin EVAMINTOX

**01/2017 – 07/2017** : Mégane NOYER (M2 Toxicologie de l'Environnement, Angers) - Encadrement 50% avec A. Vicente.

*Sujet* : étude des interactions et des flux d'éléments intervenant au sein d'un réseau trophique microbien modèle

**01/2016 – 06/2016** : Loïc MEISSE (M2 BioMANE, Nancy) - Encadrement 100%

*Sujet* : Analyse des réponses temporelles de biosenseurs pour une meilleure évaluation de la biodisponibilité et de la toxicité de métaux.

**01/2015 – 06/2015** : Anne VICENTE (M2 BioMANE, Nancy) – Encadrement 100%

*Sujet* : Mise en place d'un réseau trophique microbien et étude de l'impact des filtres solaires nanoparticulaires (TiO<sub>2</sub>) sur celui-ci.

**01/2014 – 06/2014** : Matthieu HEMMERLIN (M2 BioMANE, Nancy) – Encadrement 100%

*Sujet* : Toxicité des nanoparticules d'argent sur la cyanobactérie modèle *Synechococcus elongatus* PCC7942.

**01/2010 – 06/2010** : Stéphane JOMINI (M2 ETOX, Metz) – Encadrement 100%

*Sujet* : Toxicité des nanoparticules sur les bactéries.

#### Masters 1 :

**04/2013 – 06/2013** : Jérôme CLEACH – Encadrement 100%

*Sujet* : Effets toxicologiques des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) chez *Synechococcus elongatus*.

**04/2013 – 06/2013** : Benoit MANFROY – Encadrement 100%

*Sujet* : Modification du test d'Ames pour l'évaluation de la génotoxicité des nanoparticules.

**04/2011 – 06/2011** : Jordan HACQUIN – Encadrement 100%

*Sujet* : Utilisation du test d'Ames pour l'évaluation de la génotoxicité des nanoparticules.

**04/2009 – 06/2009** : Elsa FOURNIER – Encadrement 100%

*Sujet* : Toxicité des nanoparticules sur les bactéries, effet du milieu d'exposition.

#### Licence 3 :

**04/2019 – 06/2019** : Sonia OUCHABANE – Encadrement 100%

*Sujet* : Caractérisation de bactéries mutantes présentant le phénotype deep-rough.

**04/2015 – 06/2015** : Victor PRAGER – Encadrement 100%

*Sujet* : Effets des facteurs environnementaux sur les communautés microbiennes associées aux litières végétales en milieu aquatique.

**04/2015 – 06/2015** : Chihabeddine AOURINMOUCHE – Encadrement 100%

*Sujet* : Evaluation de la toxicité des nanomatériaux sur les algues en systèmes mésocosmes.

## 1.6. Liste des publications et communications scientifiques

---

### 1.6.1. Publications internationales dans des revues à comité de lecture

- PAGNOUT C.**, RAZAFITIANAMAHARAVO A., SOHM B., CAILLET C., BEAUSSART A., DELATOUR E., OFFROY M. DUVAL J.F.L. Osmotic stress and vesiculation as key mechanisms controlling bacterial sensitivity and resistance to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Soumis à *Nature Communications*.
- [29] OFFROY M., RAZAFITIANAMAHARAVO A., BEAUSSART A., **PAGNOUT C.**, DUVAL J., **2020**. Fast automated processing of AFM PeakForce curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of turgescient cells. *RSC Advances* 10, 19258-19275.
- [28] DUVAL J., **PAGNOUT C.**, **2020**. Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters: experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B-Chemical* 309, 127751.
- [27] **PAGNOUT C.**, SOHM B., RAZAFITIANAMAHARAVO A., CAILLET C., OFFROY M., LEDUC M., GENDRE E., JOMINI S., BEAUSSART A., BAUDA P., DUVAL J.F.L., **2019**. Pleiotropic effects of *rfa*-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Scientific Reports* 9(1):9696.
- [26] COLAS F., WOODWARD G., BURDON F.J., GUEROLD F., CHAUVET E., CORNUT J., CEBRON A., CLIVOT H., DANGER M., DANNER M.C., **PAGNOUT C.**, TIEGS S.D., **2019**. Towards a simple global-standard bioassay for a key ecosystem process: organic-matter decomposition using cotton strips. *Ecological Indicators*, 106, 105466.
- [25] DUVAL J.F.L., **PAGNOUT C.**, **2019**. Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sensors*, 4, 1373-1383.
- [24] VICENTE A., SOHM B., FLAYAC J., ROUSSELLE P., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, **2019**. Toxicity mechanisms of ZnO UV-filters used in sunscreens toward the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 22450-22463.
- [23] **PAGNOUT C.**, PRÉSENT R.-M., BILLARD P., ROTUREAU E., DUVAL J.-F.-L., **2018**. What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory *Sensors and Actuators B-Chemical* 270, 482-491.
- [22] 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 *Physical Chemistry Chemical Physics* 19 (43), 29114-29124.
- [21] BERTRAND C., ZALOUK-VERGNOUX A., GIAMBÉRINI L., POIRIER L., DEVIN S., LABILLE J., PERREIN-ETTAJANI H., **PAGNOUT C.**, CHATEL A., LEVARD C., AUFFAN M., MOUNEYRAC C., **2016**. The influence of salinity on the fate and behavior of silver standardized nanomaterial and toxicity effects in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35 (10), 2550-2561.
- [20] BOUR A., MOUCHET F., CADARSI S., SILVESTRE J., CHAUVET E., BONZOM J.M., **PAGNOUT C.**, CLIVOT H., GAUTHIER L., PINELLI E., **2016**. Impact of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the functions of

freshwater ecosystems: a microcosm study. *Environmental Science: Nano* (accepté pour publication).

- [19] GARAUD M., AUFFAN M., DEVIN S., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., PROUX O., RODIUS F., SOHM B., GIAMBERINI L., **2016**. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology*, 10(7):935-44.
- [18] BOUR A., MOUCHET F., CADARSI S., SILVESTRE J., VERNEUIL L., BAQUE D., CHAUVET E., BONZOM J.M., **PAGNOUT C.**, CLIVOT H., FOURQUAUX I., TELLA M., AUFFAN M., GAUTHIER L., PINELLI E., **2015**. Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: a study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology*, 10(2):245-55.
- [17] JOMINI S., CLIVOT H., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, **2015**. Impact of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. *Environmental Pollution*, 202: 196-204.
- [16] CORDI A., **PAGNOUT C.**, DEVIN S., POIREL J., BILLARD P., DOLLARD M.-A., BAUDA P., **2015**. Determination of physiological, taxonomic and molecular characteristics of a cultivable arsenic resistant bacterial community. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18): 13753-63.
- [15] SOHM B., IMMEL F., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, **2015**. Insight into the primary mode of action of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics*, 15(1): 98-113.
- [14] CLIVOT H., CORNUT J., CHAUVET E., ELGER A., POUPIN P., GUÉROLD F., **PAGNOUT C.**, **2014**. Leaf-associated fungal diversity in acidified streams: insights from combining traditional and molecular approaches. *Environmental Microbiology*, 16 (7): 2145-2156.
- [13] CLIVOT H., DANGER M., **PAGNOUT C.**, WAGNER P., ROUSSELLE P., POUPIN P., GUÉROLD F., **2013**. Impaired leaf litter processing in acidified streams. *Microbial Ecology*, 65 (1): 1-11.
- [12] JOMINI S., LABILLE J., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, **2012**. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215 (1): 54-61.
- [11] **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 and Surfaces. B. Biointerfaces*, 92: 315-321.
- [10] CLIVOT H., **PAGNOUT C.**, ARAN D., DEVIN S., BAUDA P., POUPIN P., GUÉROLD F., **2012**. Changes in soil bacterial communities following liming of acidified forests. *Applied Soil Ecology*, 59: 116-123.
- [9] CORNUT J., CLIVOT H., CHAUVET E., ELGER A., **PAGNOUT C.**, GUÉROLD F., **2012**. Effect of acidification on leaf litter decomposition in benthic and hyporheic zones of woodland streams. *Water Research*, 46 (19): 6430-6444.
- [8] COULEAU N., TECHER D., **PAGNOUT C.**, JOMINI S., FOUCAUD L., LAVAL-GILLY P., FALLA J., BENNASROUNE A., **2012**. Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: preliminary investigations. *Science of the Total Environment*, 438: 490-497.

- [7] RIZVI H., GAUQUELIN T., GERS C., GUÉROLD F., **PAGNOUT C.**, BALDY V., **2012**. Calcium-magnesium liming of acidified forested catchments: effects on humus morphology and functioning. *Applied Soil Ecology*, 62: 81-87.
- [6] HALTER D., CORDI A., GRIBALDO S., GALLIEN S., GOULHEN-CHOLLET F., HEINRICH-SALMERON A., CARAPITO C., **PAGNOUT C.**, MONTAUT D., SEBY F., VAN DORSSELAER A., SCHAEFFER C., BERTIN P.N., BAUDA P., ARSÈNE-PLOETZE F., **2011**. Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic-contaminated sediments. *Research in Microbiology*, 162 (9): 877-887.
- [5] HEINRICH-SALMERON A., CORDI A., BROCHIER-ARMANET C., HALTER D., **PAGNOUT C.**, ABBASZADEH-FARD E., MONTAUT D., SEBY F., BERTIN P.N., BAUDA P., ARSÈNE-PLOETZE F., **2011**. Unsuspected diversity of arsenite-oxidizing bacteria as revealed by widespread distribution of the *aoxB* gene in Prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (13): 4685-4692.
- [4] **PAGNOUT C.**, FRACHE G., POUPIN P., MAUNIT B., MULLER J.-F., FÉRARD J.-F., **2007**. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Research in Microbiology*, 158 (2): 175-186.
- [3] **PAGNOUT C.**, FÉRARD J.-F., POUPIN P., **2006**. Characterization of IS1110-like sequences found in *Mycobacterium* species other than *Mycobacterium avium*. *Research in Microbiology*, 157 (7): 650-658.
- [2] **PAGNOUT C.**, RAST C., VEBER A.-M., POUPIN P., FÉRARD J.-F., **2006**. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp. strain SNP11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65 (2): 151-158.
- [1] MAIRE M.-A., RAST C., **PAGNOUT C.**, VASSEUR P., **2005**. Changes in expression of bcl-2 and bax in Syrian hamster embryo (SHE) exposed to ZnCl<sub>2</sub>. *Archives of Toxicology*, 79 (2): 90-101.

### 1.6.2. Chapitre d'ouvrage

- [1] **PAGNOUT C.**, JOMINI S., BAUDA P., **2014**. Revised procedure of the bacterial reverse mutation test for genotoxic evaluation of nanoparticles, Chapter 3. In/ Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, eds L. María Sierra; I Gaivão, Springer New York - DOI: 10.1007/978-1-4939-1068-7\_3. ISBN: 978-1-4939-1068-7

### 1.6.4. Communications orales (\* invité) (>2009)

- [27] **PAGNOUT C.**, RAZAFITIANAMAHAVARO A., SOHM B., CAILLET C., DELATOUR E., OFFROY M., BEAUSSARD A., DUVAL J. 2019. Évaluation multi-échelles de la toxicité des nanoparticules sur les bactéries. Journées de la Fondation Rovaltin, Valence, France (15/11/2019).
- [26] **GIAMBERINI L.**, **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., AUFFAN M., BOTTERO J.Y., DEVIN S. 2017. Integrated effect evaluation of metallic nanoparticles on a simplified freshwater food chain of microorganisms and bivalves, an overview. Final Conference of the Cost Action ES1205 (Engineered nanomaterials from wastewater treatment and storm water to rivers), 7-8 février 2017, Aveiro, Portugal.
- [25] **PAGNOUT C.** 2016. Ecotoxicité des Nanomatériaux et risques pour l'environnement. Journée Promotion Procédés Produits - « Nanoparticules : quels risques ? quelles protections ? ». ENSIC, Nancy, France (13/10/2016)

- [24] DUVAL J., PRESENT R., PINHERO J.-P., BILLARD P., **PAGNOUT C.**, ROTUREAU E. 2016. Kinetic and thermodynamic determinants of metal partitioning at biointerfaces: impacts of intracellular speciation dynamics. IAP2016 Lleida, Espagne.
- [23] BERTRAND C., DEVIN S., MOUNEYRAC C., AUFFAN M., CHATEL A., KOELHE-DIVO V., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., PARIAT H., PERREIN H., POIRIER L., ZALOUK-VERGNOUX A., GIAMBERINI L. 2016. Cross effects of salinity and ceria nanoparticles on two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*: multibiomarker assessment. 26<sup>ème</sup> congrès annuel de la « Society of Environmental Toxicology and Chemistry », SETAC Europe (22-26 mai, Nantes, France).
- [22] BERTRAND C., ZALOUK-VERGNOUX A., MOUNEYRAC C., POIRIER L., CHATEL A., PERREIN-ETTAJANI H., AUFFAN M., TELLA M., **PAGNOUT C.**, DEVIN S., GIAMBERINI L., 2015. Influence of salinity on fate and behavior of silver-based manufactured nanomaterials and toxicity effects toward two endobenthic bivalves *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. SETAC Barcelone.
- [21] DEVIN S., BAUDA P., BAUDOIN J.-M., CLIVOT H., **PAGNOUT C.**, COLAS F., 2015. Multi-scale evaluation of multi-stressed ecosystems: an overview of a physical x chemical stressor study. SETAC Barcelone.
- [20] SOHM B., JOMINI S., IMMEL F., CAILLET C., RAZAFITIANAMAHARAVO A., THOMAS F., FRANCIUS G., DUVAL J.F.L., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2015. Bactericidal effect of titanium dioxide nanoparticles: an overview of the toxicity mechanism. SETAC Barcelone.
- [19] GARAUD M., ANDREI J., AUFFAN M., BERTRAND C., BRULE N., DEVIN S., DOLLARD M.-A., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., POINSAINT J.-F., PROUX O., RODIUS F., ROUSSELLE P., TELLA M., WAGNER P., GIAMBERINI L., May 2014, Long term effects of cerium dioxide nanoparticles (nCeO<sub>2</sub>) on a simplified food chain of micro-organisms and zebra mussels, SETAC Bâle, Suisse.
- [18] BAUDA P., RISSER T., DEVIN S., SOHM B., DOLLARD M.-A., ROUSSELLE P., **PAGNOUT C.**, CASIOT C., May 2014, Analysis of factors affecting arsenic speciation in neutral contaminated mine drainage, 5th International Congress on Arsenic in the Environment, Buenos Aires, Argentine.
- [17] **\*PAGNOUT C.**, 2013, Approche multiparamétrique pour la compréhension des mécanismes d'action bactéricide des nanoparticules, Atelier thématique Nano-environnement, CNRS Mission pour l'interdisciplinarité, Paris, France.
- [16] GARAUD M., COSSU-LEGUILLE C., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., GIAMBERINI L., Juillet 2013, Multibiomarker assessment of cerium and titanium dioxide nanoparticles sublethal effects on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*, 8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, Aix en Provence, France.
- [15] PAIN-DEVIN S., GARAUD M., COULEAU N., ANDREI J., BENNASROUNE A., COSSU-LEGUILLE C., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, GIAMBERINI L., Juillet 2013, Nanoparticules : comment évaluer leurs effets potentiels sur les milieux aquatiques ? Congrès SEFA, Thionville, France.
- [14] SOHM B., **PAGNOUT C.**, IMMEL F., BAUDA P., Juillet 2013, Approches multiparamétriques pour la compréhension des mécanismes de toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> chez *Escherichia coli*, Congrès SEFA, Thionville, France.
- [13] M. GARAUD, A. BENNASROUNE, C. CHANEAC, C. COSSU-LEGUILLE, N. COULEAU, S. DEVIN, V. FELTEN, B. MARCHAL, K. MEHENNAOUI, **C. PAGNOUT**, S. PAIN-DEVIN, F. RODIUS, Z. CYRIELLE, L. GIAMBERINI, 2013. Multibiomarker assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles effects on *Dreissena*

*polymorpha* and *Gammarus roeseli*: influence of shape and crystal structure. SETAC Glasgow, 15/05/2013.

- [12] SOHM B., IMMEL F., BAUDA P., **PAGNOUT C.** (2013) - Omics investigation in titanium dioxide nanoparticles impact on *Escherichia coli*. 1st Workshop « Metals, PAHs and Nanoparticles ». (05 Fevrier 2013), Belvaux, Luxembourg.
- [11] GARAUD M., TRAPP J., BRULÉ N., COSSU-LEGUILLE C., DAOUD A., FELTEN V., MARCHAL B., MEHENNAOUI K., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., POINSAINT J.-F., ROUSSELLE P., WAGNER P., ZANUTTINI C., GIAMBÉRINI L., 2012. Multibiomarker assessment of cerium and titanium dioxide nanoparticles (nCeO<sub>2</sub> and nTiO<sub>2</sub>) sublethal effects on freshwater invertebrates. IAP 2012. 7th International conference Interfaces against pollution Nancy, 11-14/06/2012.
- [10] CLIVOT H., CORNUT J., GIERLINSKI P., DANGER M., **PAGNOUT C.**, POUPIN P., ELGER A., CHAUVET E., GUÉROLD F., 2011. Diversity and activities of fungal communities associated with decaying leaves in acidified headwater streams. SAME12. 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology. Rostock, Allemagne, 28/08-02/09/2011.
- [9] JOMINI S., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2012. Electrostatic interactions between nanoparticles and bacteria: how a simple modification of the Ames test revealed mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles? IAP 2012. 7th International conference Interfaces against pollution Nancy, 11-14/06/2012.
- [8] JOMINI S., CLIVOT H., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2011. Effects of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the planktonic bacterial communities from the Moselle River (France). *HENVI2011. International Conference on Health and Environment. Frontiers in Environmental Health: Challenges to Water Safety*. Luxembourg, 28/10/2011.
- [7] JOMINI S., **PAGNOUT C.**, BAUDA P., 2011. Effets des nanoparticules d'oxydes métalliques sur les bactéries. *Journées scientifiques de la Zone Atelier Moselle*. Celles-sur-Plaine, 12-13/05/2011.
- [6] JOMINI S., BAUDA P., **PAGNOUT C.** *Capacity building for Direct Water Reuse in the Mediterranean Area (FP7-INCO-2010-6, ERAWIDE, Area INCO.2010-6.2). Workshop on Capacity building in innovative sustainable technologies for water treatment*. Nancy, 11-13/10/2011.
- [5] CLIVOT H., **PAGNOUT C.**, ROUSSELLE P., WAGNER P., POUPIN P., GUEROLD F., juin 2010, Acidification of headwater streams: structural and functional assessment of microbial communities associated with decaying leaves, NABS, Santa Fe, USA.
- [4] HEINRICH-SALMERON A., CORDI A., BROCHIER-ARMANET C., HALTER D., **PAGNOUT C.**, ABBASZADEHFARD E., MONTAUT D., SEBY F., BERTIN P., BAUDA P., ARSENE-PLOETZE, Mai 2010, Microbial taxonomic and functional diversity in sediments of mine drainage, 3rd International Congress of Arsenic in the Environment, Tainan Taiwan.
- [3] \***PAGNOUT C.**, DADHWAL M., BAUDA P., Nov 2009, Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on bacteria: can we predict the toxicity?, YESSnano 2009, Paris Saclay.
- [2] AUCLERC A., ARAN D., **PAGNOUT C.**, MASFARAUD J.-F., GUEROLD F., NAHAMANI J., Mai 2009, Impact d'un amendement calco-magnésien sur la macrofaune du sol et sur certains processus fonctionnels associés dans les Vosges, 10<sup>ème</sup> journée d'étude des sols, Strasbourg.

- [1] CLIVOT H., ARAN D., ROUSSELLE P., AUCLERC A., DEVIN S., NAHMANI J., WAGNER P., BAUDA P., POUPIN P., **PAGNOUT C.**, GUEROLD F., Mai 2009, Restauration de bassins versants acidifiés : effet sur la diversité des communautés bactériennes du sol, 10<sup>ème</sup> journée d'étude des sols, Strasbourg.

### **1.6.5. Communications affichées >2009**

- [23] VICENTE A., BAUDA P., **PAGNOUT C.** 2019. Développement d'un réseau trophique microbien standardisé pour l'évaluation de la toxicité des contaminants. IX Colloque de l'AFEM, Bussang, France (5-8/11/19).
- [22] VICENTE A., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2017. Response of the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* to nanoparticle-ZnO UV-filters used in sunscreens. Final Conference of the Cost Action ES1205 (Engineered nanomaterials from wastewater treatment and storm water to rivers), 7-8 février 2017, Aveiro, Portugal.
- [21] **PAGNOUT C.**, RAZAFITIANAMAHARAVO A., SOHM B., CAILLET C., BIHANNIC I., BAUDA P., BEAUSSARD A., DUVAL J.F.L. 2016. Evaluation of molecular and interfacial biophysical endpoints for nanoparticle toxicity toward bacteria. 3<sup>ème</sup> colloque de la Fondation Roaltin (Valence, France – 9 oct 2016).
- [20] VICENTE A., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2016. Development of a multispecies standardized aquatic nanocosm (MSAN) for the assessment of the toxicant effects: effect of mineral sunscreen nanocomposites. Internano - COST meeting (Landau, Allemagne – 20 & 21 oct. 2016).
- [19] GARAUD M., DEVIN S., FELTEN V., AUFFAN M., BERTRAND C., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., RODIUS F., SOHM B., ROUSSELLE P., TELLA M., WAGNER P., GIAMBERINI L., 2015. Integrated discriminant biomarker analysis as a tool to reveal the effects of metallic nanoparticles on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* following mesocosm exposures. SETAC Barcelone
- [18] ATARODI S., GILIBERT D., SCHNEIDER B., THIEBAUT E., TONIOLO A.M., PARIS C., GRISON D., GUIGNARD L., DALMASSO S., CHAIMBAULT P., GAFFET E., HEHN M., ROUXEL D., VERGNAT M., ANDREI J., GARAUD M., JOMINI S., CAILLET C., BENNASROUNE A., COTELLE S., COSSU-LEGUILLE C., **PAGNOUT C.**, GIAMBERINI L., BAUDA P., GAUMET J.J., LIGHEZZOLO-ALNOT J., Juillet 2013, Nanotechnologies, risk perception, social and human sciences: an opened field to transdisciplinarity. *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.
- [17] SANTIAGO-MORALES J., VIGNATI D.A.L., **PAGNOUT C.**, FERARD J.-F., SOHM B., ROSAL R., Juillet 2013, Behaviour and toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in standardized laboratory tests with freshwater algae, *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.
- [16] GARAUD M., ANDREI J., AUFFAN M., BERTRAND C., BRULE N., DEVIN S., DOLLARD M.-A., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., POINSAINT J.-F., PROUX O., RODIUS F., ROUSSELLE P., TELLA M., WAGNER P., GIAMBERINI L., Juillet 2013, Aquatic mesocosm study of cerium dioxide nanoparticle effects on micro-organisms and invertebrates, *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.
- [15] JOMINI S., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, Juillet 2013, Modified Ames test for evaluation of nanomaterials, *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.

- [14] JOMINI S., CLIVOT H., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, Juillet 2013, Effects of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on planktonic and biofilm bacterial communities from the Moselle river (France), *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.
- [13] SOHM B., **PAGNOUT C.**, IMMEL F., BAUDA P., Juillet 2013, Insights into the primary mode of action of titanium dioxide nanoparticles on *Escherichia coli*, *8<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix en Provence, France.
- [12] PAIN-DEVIN S., GARAUD M., COULEAU N., ANDREI J., BENNASROUNE A., COSSU-LEGUILLE C., FELTEN V., **PAGNOUT C.**, GIAMBERINI L., Juillet 2013, Nanoparticules : comment évaluer leurs effets potentiels sur les milieux aquatiques ? Congrès SEFA, Thionville, France.
- [11] RISSER T., SOHM B., CASIOT C., DOLLARD M.-A., **PAGNOUT C.**, BAUDA P., Juillet 2013, Impact des systèmes bactériens de détoxification de l'arsenic sur sa spéciation, Congrès SEFA, Thionville, France.
- [10] SANTIAGO-MORALES J., VIGNATI D., **PAGNOUT C.**, FERARD J.-F., ROSAL R., 2013. Insights on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and nanomaterials on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. SETAC Glasgow, 15/05/2013.
- [9] GARAUD M., TRAPP J., BRULÉ N., COSSU-LEGUILLE C., DAOUD A., FELTEN V., MARCHAL B., MEHENNAOUI K., **PAGNOUT C.**, PAIN-DEVIN S., POINSAINT J.-F., ROUSSELLE P., WAGNER P., ZANUTTINI C., GIAMBÉRINI L., 2012. Evaluation des effets sublétaux du dioxyde de titane et du dioxyde de cérium (nCeO<sub>2</sub> et nTiO<sub>2</sub>) sur les invertébrés dulçaquicoles. Ecobim. Reims, 05-08/06/2012.
- [8] COULEAU N., TÉCHER D., **PAGNOUT C.**, JOMINI S., FOUCAUD L., LAVAL-GILLY P., DURANDET C., HENRY S., FALLA J., BENNASROUNE A., 2012. Effects of titanium dioxide nanoparticles on the immune system of *Dreissena polymorpha*. 6th SETAC World Congress 2012. 22nd Annual meeting of SETAC Europe. Berlin, 20-24/05/2012.
- [7] JOMINI S., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, 2011. Mutagenicity of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles and a TiO<sub>2</sub>-based nanomaterial revealed by a simple modification of the Ames test. *HENVI2011. International Conference on Health and Environment. Frontiers in Environmental Health: Challenges to Water Safety*. Luxembourg, 28/10/2011.
- [6] CORDI A., DEVIN S., **PAGNOUT C.**, MORIN G., ONA-NGUEMA G., BAUDA P., Juin 2011, Bacterial genes involved in arsenic speciation in sediment, FEMS Microbiology Congress, Genève, Suisse.
- [5] JOMINI S., **PAGNOUT C.**, BAUDA P., Avril 2011, Modification of the Ames test reveals mutagenicity of manufactured titanium dioxide nanoparticles. *Conférence INRS Nano*. Nancy, 05-07/04/2011.
- [4] DADHWAL M., BOTTA C., LABILLE J., ROSE J., BAUDA P., **PAGNOUT C.**, Mai 2010, Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and residues from the degradation of commercialized TiO<sub>2</sub>-based nanomaterials on bacteria, SETAC, Seville.
- [3] CORDI A., HEINRICH-SALMERON A., GOULHEN-CHOLLET F., HALTER D., **PAGNOUT C.**, BERTIN P., ARSENE-PLOETZE F., BAUDA P., Sept 2009, Diversité et étude des métabolismes microbiens de l'arsenic d'un ancien site minier, 4<sup>ème</sup> édition du colloque de l'AFEM, Lyon.

- [2] FOURNIER E., DADHWAL M., **PAGNOUT C.**, Sept 2009, Impact des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur les bactéries, 4<sup>ème</sup> édition du colloque de l'AFEM, Lyon.
- [1] CLIVOT H., ARAN D., ROUSSELLE P., AUCLERC A., DEVIN S., NAHMANI J., WAGNER P., BAUDA P., POUPIN P., **PAGNOUT C.**, GUEROLD F., Sept 2009, Impact d'un amendement calco-magnésien sur la diversité bactérienne de sols acidifiés, 4<sup>ème</sup> édition du colloque de l'AFEM, Lyon.

#### **1.6.6. Communications grand public**

- [4] PAGNOUT C. Ecologie des cyanobactéries, solutions préventives et curatives. Sous-préfecture de Sarrebourg-Château-Salins, 6/12/19. Réunion d'information à destination des élus locaux, associations de pêche et clubs de triathlon.
- [3] PAGNOUT C., JOUBERT O. Les nanotechnologies, entre promesses et incertitudes. Pint of Science 15/05/2017, Nancy
- [2] GIAMBERINI L., **PAGNOUT C.** (2014) - Nanoparticules : de l'homme aux écosystèmes. Conférence Association Philomathique d'Alsace et de Lorraine. Institut de Botanique de Strasbourg, France.
- [1] **PAGNOUT C.**, GAUMET J.-J., ROYER F.X. (4 juin 2013) - Débat publique : « Nanotechnologies : les nouveaux matériaux, avantage ou risque », Thionville, France.

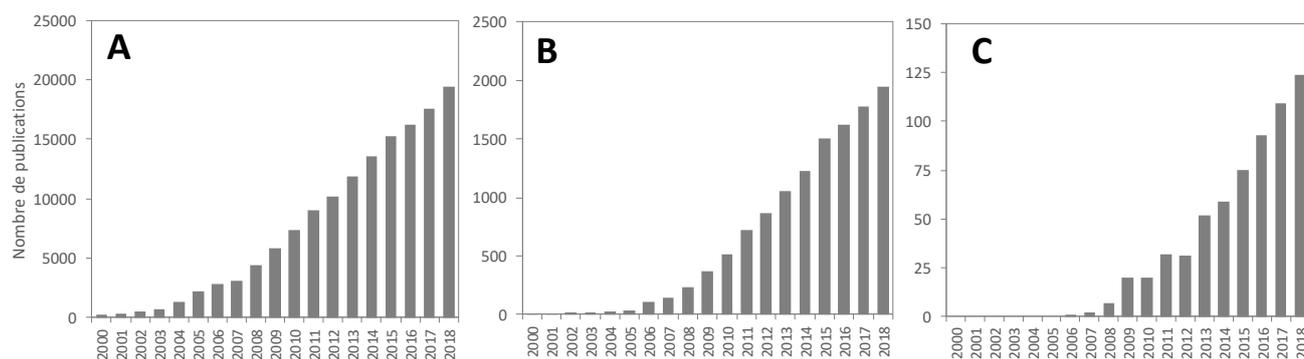


## 2. Activités de recherche

### 2.1. Préambule

Mes activités de recherche se sont depuis toujours intéressées aux relations complexes existantes entre bactéries de l'environnement et composés d'origines anthropiques. Un premier volet réalisé durant mes années de doctorat (Metz, 2002-2005) concernait la dégradation de Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) de hauts poids moléculaires par *Mycobacterium* sp. SNP11, une bactérie que j'avais isolée de l'environnement lors mon stage de DEA. Ces travaux ont notamment permis l'identification des gènes impliqués dans la dégradation de ces composés et leur clonage/expression dans la souche modèle *Mycobacterium smegmatis*. Ainsi transformée, cette souche originellement non-dégradante était en mesure de de dégrader un large panel de HAP. Mes travaux de post-doctorat (Rutgers Univ., NJ, USA, 2006-2007) se sont ensuite focalisés sur l'étude des effets de différents Polychlorobiphényles (PCB) sur la diversité et la structure de communautés bactériennes des sols/sédiments et sur l'identification des voies de dégradation. A la suite à mon recrutement comme Maître de Conférences (Metz, septembre 2007) au LIEC, j'ai eu la chance de pouvoir m'impliquer rapidement dans deux axes de recherche déjà bien établis au laboratoire – *le premier étant l'étude des effets d'un amendement calco-magnésien sur les communautés microbiennes de sols forestier (co-direction de la thèse de Hugues Clivot avec F. Guerold et P. Poupin) et le second étant l'étude de l'impact des métaux/métalloïdes sur la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes (co-direction de la thèse de Audrey Cordi avec P. Bauda)* – et de pouvoir en définir un nouveau relatif à **l'activité bactéricide des nanoparticules sur les micro-organismes**. Grâce au soutien financier de divers organismes de recherche (ANR, programme EC2CO, région Lorraine, Fondation Rovaltin, pôle scientifique Otelo), ce troisième axe occupe la majorité de mon temps recherche depuis maintenant une dizaine d'années. Ainsi, dans un souci de cohérence et de clarté pour le lecteur, seules les activités de recherche associées à cette problématique seront développées dans le présent document. Cependant, je tiens avant tout à préciser que ces travaux n'aurait jamais pu atteindre un tel degré d'aboutissement sans l'étroite collaboration et confiance de mes collègues microbiologistes, biologistes moléculaires et physicochimistes – *et notamment, pour ne citer qu'eux, Pascale Bauda, Bénédicte Sohm, Jérôme Duval, Angéline Razzafitianamaharavo et Céline Caillet* – et sans le travail assidu de plusieurs doctorants (Stéphane Jomini et Anne Vicente en codirection avec P. Bauda ; Eva Delatour en codirection avec J. Duval) et stagiaires de Master/Licence. L'usage du *nous* sera donc plus que jamais de rigueur dans ce manuscrit.

## 2.2. Contexte - Effets bactéricides des particules nanométriques



**Figure 1.** Nombre de publications contenant les termes ‘nanoparticles or nanomaterials’ (A), ‘nanoparticles or nanomaterials and toxicity’ (B), ‘nanoparticles or nanomaterials and toxicity and bacteria’ (C) dans leurs titres et/ou résumés. Recherche effectuée sur NCBI PubMed.

Ces 20 dernières années, les nanotechnologies ont connu un essor important dans de multiples secteurs d’activités (*e.g.* santé, environnement, énergie, industrie) et ont fait l’objet de nombreux travaux de recherche et de développement (**Fig. 1 A**). Cependant, peut-être en conséquence des expériences passées (*i.e.* impact (éco)toxicologique des PCB, DDT), les nanoparticules/nanomatériaux (NP/NM) manufacturés soulèvent de nombreuses inquiétudes quant à leurs effets sur la santé et l’environnement. Leurs effets (éco)toxicologiques ont été largement documentés (**Fig. 1 B**) et dépendraient de nombreux facteurs comme par exemple la taille des particules, leur forme, structure chimique, charges de surface, porosité, solubilité (review : Auffan *et al.*, 2009). Les principaux mécanismes de toxicité impliqueraient la génération d’espèces réactives de l’oxygène (ROS) responsables de dommages cellulaires importants. Ces ROS pouvant impacter le fonctionnement et le développement des cellules *via* la modification/dénaturation des protéines, l’altération des membranes (peroxydation lipidique), des lésions à l’ADN/ARN (adduits, mutations, cassures simple/double brin) conduisant à des mécanismes inflammatoires, des effets génotoxiques et *in fine* la mort cellulaire (review : Fu *et al.*, 2014). Malgré cette toxicité avérée des NP, la production mondiale ne cesse de croître (Jankovic and Plata, 2019) et, d’après le *Nanotechnology Consumer Products Inventory*, le nombre de produits du quotidien contenant des NP en 2015 avoisinait les 1500 (Vance *et al.*, 2015). Le rapport bénéfice/risque reste en effet majoritairement favorable aux nanotechnologies en raison notamment de l’absence de consensus scientifique sur la toxicité des NP. Ceci est notamment dû à la très grande diversité de NP actuellement présente sur le marché et au manque de reproductibilité des études (éco)toxicologiques lié notamment aux propriétés physicochimiques singulières des nanoparticules et à leurs comportements dans les milieux d’exposition (*i.e.* agrégation, sédimentation, solubilisation) ; mais également au manque de réalisme environnemental de ces

études (type de nanoparticules évaluées, concentrations testées, scénario d'exposition) rendant l'évaluation du risque extrêmement difficile.

L'évaluation du pouvoir bactéricide des nanoparticules/nanomatériaux et la compréhension des mécanismes régissant leurs toxicités ont fait l'objet de plus de 600 études ces 10 dernières années (**Fig. 1 C**) et sont à ce jour au centre de nombreux questionnements scientifiques et d'applications technologiques :

- **Impact environnemental.** Les bactéries sont des acteurs importants de nos écosystèmes en contribuant notamment à la dégradation des matières organiques et au recyclage des nutriments. Elles sont impliquées dans de nombreux cycles biogéochimiques et participent par exemple à la fixation de l'azote atmosphérique et à la minéralisation de l'azote organique *via* des processus successifs d'ammonification, nitrification et dénitrification. Les bactéries autotrophes (cyanobactéries) jouent également un rôle essentiel dans la biosphère en assimilant de dioxyde de carbone qu'elles transforment en oxygène *via* le cycle de Calvin. Plusieurs espèces de cyanobactéries sont également capables de fixer l'azote atmosphérique. De par leur utilisation massive, les NP sont aujourd'hui présentes dans de nombreux écosystèmes où elles interagissent avec les (micro)organismes indigènes. La compréhension de ces interactions, ainsi que l'évaluation de leurs effets sur la diversité bactérienne et sur les processus fonctionnels associés sont autant d'éléments essentiels à considérer lors de l'évaluation du risque environnemental.
  
- **Bioessais en écotoxicologie.** De nombreux tests *in vitro* sur bactéries ont été développés et standardisés dans le but d'évaluer la toxicité aiguë (*e.g.* Microtox) et le caractère mutagène/génotoxique (*e.g.* Ames, Mutatox, SOS-Chromotest, Umu Test, Vitotox) des substances chimiques. Ces tests sur bactéries sont simples, rapides, peu onéreux, et sont souvent le premier (parfois le seul) niveau d'évaluation (éco)toxicologique avant l'utilisation de tests plus complexes sur eucaryotes et/ou sur lignées cellulaires. L'utilisation de ces tests a été renforcée ces dix dernières années dans le cadre de la réglementation REACH. Ces tests normalisés bactériens ont été très largement utilisés pour l'évaluation des NP mais semblent peu pertinents au regard des propriétés physicochimiques particulières des NP. L'adaptation des tests existants ou le développement de nouveaux nécessitent de comprendre les processus physicochimiques qui régissent le comportement des NP dans les milieux d'exposition ainsi que leurs interactions avec les bactéries.
  
- **Lutte contre les BMR.** Les bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) sont devenues un problème majeur de santé publique. Les stratégies de lutte alternatives à l'utilisation des

antibiotiques se multiplient et l'utilisation des nanoparticules comme agent antimicrobien ou comme vecteurs d'agents biocides sont des solutions extrêmement prometteuses. Cependant, elles nécessitent encore à ce jour des études complémentaires afin d'améliorer la spécificité des nanoparticules pour la bactérie pathogène ciblée (identification des cibles moléculaires, fonctionnalisation des nanoparticules avec des anticorps) et la compréhension des mécanismes d'action de ces NP.

- **Effets sur les bactéries commensales.** La flore commensale (*i.e.* flore cutanée, respiratoire, génitale et digestive) joue un rôle primordial dans la physiologie des organismes en exerçant un rôle de barrière physique contre les pathogènes externes. Dans le cas de la flore intestinale, on sait aujourd'hui que celle-ci joue un rôle dans les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques. Cette thématique est devenue centrale pour la recherche ces dernières années. Les effets induits par les NP présentes dans de nombreux produits de consommation (*e.g.* produits d'hygiène, cosmétiques, crèmes solaires, aliments) sur les bactéries commensales doit faire l'objet d'études plus approfondies.
- **Assainissement/stérilisation de l'eau.** Les NP sont utilisées dans de nombreux procédés biotechnologiques, notamment dans le domaine du traitement de l'eau. Le pouvoir bactéricide des NP sous rayonnement UV (photocatalyse du TiO<sub>2</sub> et ZnO) et la capacité des NP solubles (Ag, CuO, ZnO) à libérer leurs ions toxiques pour les microorganismes dans le milieu ont été largement documentés ces dernières années. L'efficacité de ces traitements repose essentiellement sur la compréhension des principes physicochimiques qui gouvernent le comportement des NP dans le milieu d'exposition (*e.g.* homoagrégation, hétéroagrégation avec les bactéries et/ou avec les acides humiques/fulviques présent dans le milieu, cinétique de dissolution).

Les travaux exposés dans le présent document s'intéressent donc logiquement à la compréhension des mécanismes régissant la toxicité des NP sur les bactéries, en considérant (*i*) le comportement des NP dans les milieux d'exposition, (*ii*) la phase d'approche/adsorption des NP vers/sur la surface bactérienne ainsi que leurs potentielles internalisations, (*iii*) les effets délétères sur les cellules bactériennes pouvant induire une perte d'activité/viabilité. **Les différentes échelles d'observation considérées pouvant aller du local sur cellule isolée à la communauté microbienne** *via* l'utilisation d'approches multiples et complémentaires en microscopie, biologie moléculaire, protéomique, biochimie, nanomécanique, et/ou électrocinétique. A noter qu'au moment où ces travaux ont été initiés (2009), la littérature relative à la toxicité des NP sur les bactéries était peu abondante (30 publications entre 2006 et 2009) (**Fig. 1 C**) et fortement controversée. Elle s'est ensuite rapidement fait beaucoup plus riche et consistante, nécessitant une remise en question fréquente de

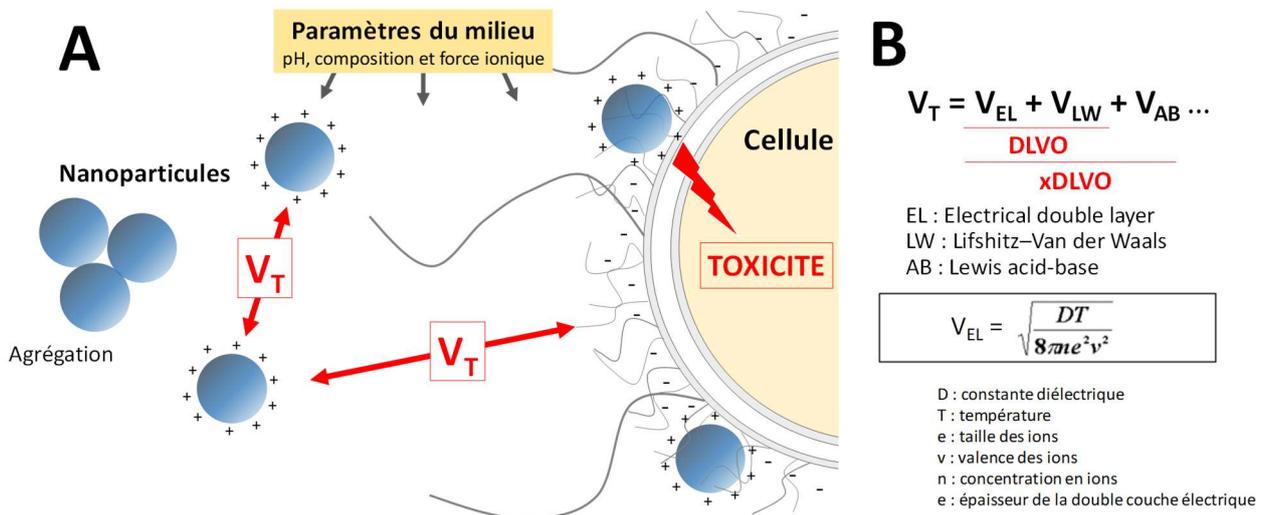
nos activités de recherche et de nos objectifs face à l'existant. En effet, de nombreuses connaissances considérées comme acquise aujourd'hui ne l'étaient absolument pas il y a 10 ans. A titre d'exemple, nous pouvons citer les travaux de Jiang *et al.* (2009), Hu *et al.* (2009) et Simon Deckers *et al.* (2009) relatifs à la toxicité des NP-TiO<sub>2</sub> à l'obscurité sur la bactérie modèle *Escherichia coli*. Ces 3 études publiées la même année ont respectivement mis en évidence l'absence de toxicité des NP (gamme testée 0-20 mg/L), une CE<sub>50</sub> de 1104 mg/L et une CE<sub>50</sub> <100 mg/L. Nous savons désormais que de très nombreux paramètres sont susceptibles d'expliquer de telles différences. C'est le cas par exemple des propriétés intrinsèques des NP-TiO<sub>2</sub> testées (*e.g.* taille, forme, physicochimie), des méthodes de dispersion de ces NP dans la suspension mère (*e.g.* vortex, sonication par bain à ultrasons ou à l'aide d'une sonde, utilisation d'un dispersant), de l'état physiologique des cellules bactériennes exposées (*e.g.* phase exponentielle de croissance, phase stationnaire), des conditions d'exposition (*e.g.* physicochimie du milieu d'exposition, durée, agitation ou non), ou bien encore des méthodes utilisées pour évaluer la toxicité (*e.g.* CFU, croissance en milieu liquide, utilisation de sondes fluorescentes).

Dans ce contexte, mes travaux de recherche se sont dans un premier temps orientés sur le rôle joué par la physicochimie du milieu (pH, force ionique, composition élémentaire) sur les interactions électrostatiques NP-NP (agrégation) et NP-bactéries, ainsi que sur le degré de toxicité résultant de ces interactions (**Chapitre 2.3.1**). Dans la continuité de ces travaux, je me suis focalisé sur des aspects plus mécanistiques de la toxicité avec notamment la compréhension des mécanismes d'action bactéricides de ces NP (**Chapitre 2.3.2**), ainsi que le rôle joué par l'interphase bactérienne dans la sensibilité/résistance des bactéries (**Chapitre 2.3.3**). Ces travaux ont été essentiellement réalisés à l'échelle de la cellule et/ou de la population sur des microorganismes modèles (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Synechococcus elongatus*). Afin de mieux appréhender le risque lié à l'utilisation et au rejet des NP dans l'environnement, des expérimentations sur communautés bactériennes naturelles ont également été menées en systèmes microcosmes et mésocosmes multi-espèces (mésocosmes multi-trophiques) (**Chapitre 2.3.4**).



## 2.3. Synthèse des activités de recherche

### 2.3.1. Rôle des interactions électrostatiques dans la (généto)toxicité des NP sur les bactéries

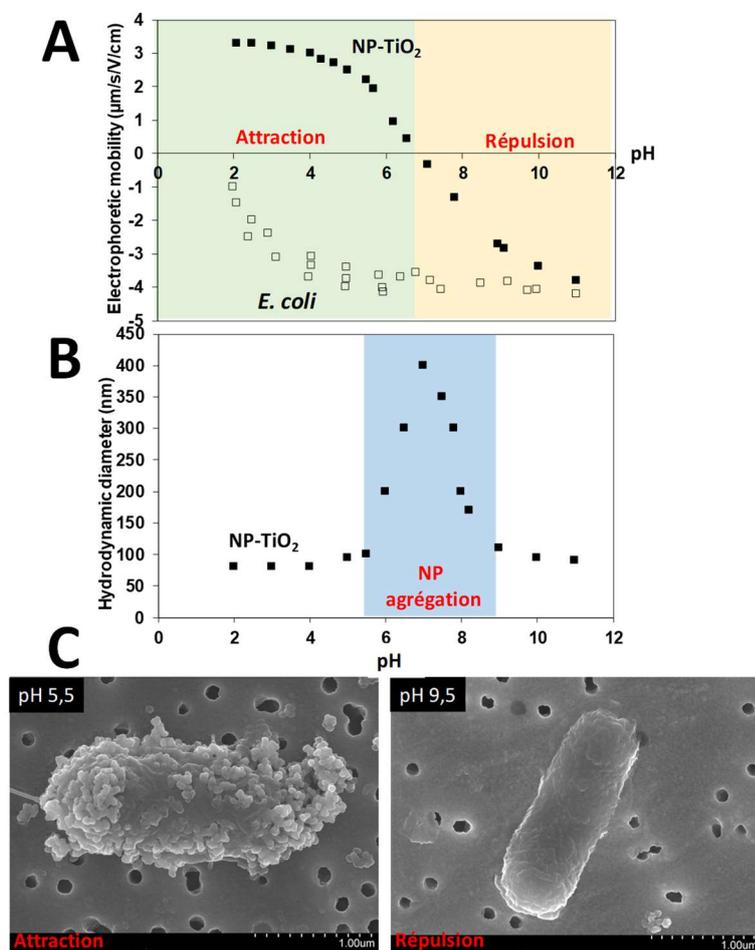


**Figure 2. A.** Représentation schématique des interactions NP-NP et NP-bactéries en milieu aqueux. **B.** théories DLVO et xDLVO relatives à la stabilité des colloïdes en phase aqueuse.

En 2009, date à laquelle ces travaux ont été initiés, les mécanismes d'action des nanoparticules sur les bactéries étaient soumis à controverse et soulevaient de nombreux questionnements. Pour ce qui est des NP solubles, les effets bactéricides étaient majoritairement attribués aux ions métalliques libérés dans le milieu par les NP. Cependant, pour de nombreuses études, les niveaux de toxicité observés ne pouvaient pas être imputés à ces seuls ions (écart de toxicité entre ces NP et les contrôles ioniques). Dans le cas des nanoparticules non-solubles la toxicité a été attribuée aux ROS générés après irradiation UV des NP. Certains auteurs ont cependant reporté une perte de viabilité significative des bactéries même en l'absence de lumière suite à l'adsorption des NP sur les cellules (Jiang *et al.*, 2009; Fenoglio *et al.*, 2009). Sur la base de ces observations, l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de toxicité annexe à ceux précédemment évoqués a été avancée (Jiang *et al.*, 2009).

Nos travaux de recherche se sont donc intéressés dans un premier temps aux relations existantes entre la physicochimie du milieu d'exposition, les interactions NP-bactéries, et la perte de viabilité cellulaire (**Fig 2. A**). D'un point de vue thermodynamique, la théorie relative à la stabilité des suspensions colloïdales développée dans les années 1940 (*i.e.* DLVO) décrit les interactions s'exerçant entre particules comme la balance entre une énergie attractive courte portée (forces de Van der Waals

-  $V_{LW}$ ) et une énergie répulsive longue portée (forces de électrostatiques -  $V_{EL}$ ) (**Fig 2. B**) (Derjaguin and Landau 1941, Verwey and Overbeek 1948). Contrairement aux  $V_{LW}$ , les  $V_{EL}$  sont régies par la physicochimie du milieu (*i.e.* concentration, charge, valence, taille des ions). Les domaines de validité des équations décrivant la théorie DLVO sont relativement restreints. Cependant, ces équations permettent en première approche une description simple de la plupart des systèmes. Cette théorie a été ensuite étendue (xDLVO) en intégrant l'énergie d'hydratation ( $V_{AB}$ ). D'autres forces d'interactions non prises en compte par ces deux modèles peuvent également être considérées, comme par exemple les forces hydrophobes ou les interactions stériques décrites pour les particules 'molles' (Oshima, 2014).



**Figure 3. A.** Mobilité électrophorétique des NP-TiO<sub>2</sub> (carrés noirs) et d'*Escherichia coli* (carrés blancs) à différents pH dans du NaCl 0,1 mM. **B.** Diamètre hydrodynamique des NP-TiO<sub>2</sub> dans du NaCl 0,1 mM. **C.** Images en microscopie électronique à balayage d'*E. coli* après 20 h d'exposition aux NP-TiO<sub>2</sub> dans du NaCl 0,1 mM à pH. 5,5 et 9,5.

Nos résultats obtenus sur la bactérie modèle *Escherichia coli* exposée à des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> P25 (Evonik Degussa) sont en accord avec ces théories et ont permis de mettre en évidence le rôle déterminant du milieu d'exposition sur l'activité bactéricide des NP (**Fig. 3**). En effet, les expositions réalisées à différents pH dans des milieux salins de compositions et forces ioniques (FI) variables ont mis en évidence qu'à pH acide et faible FI, les NP chargées positivement s'adsorbent sur la surface des

bactéries chargées négativement et induisent des effets délétères majeurs. A pH basique et faible FI, les NP et les bactéries sont chargées négativement et n'interagissent que très faiblement. Dans ce cas, aucune toxicité des NP n'est observée sur les bactéries. A pH proche du point isoélectrique des NP-TiO<sub>2</sub> (pH ± 7.0), les NP s'agrègent fortement, interagissent peu avec les bactéries et induisent, de ce fait, une faible toxicité. Comme attendu par la théorie, il a également été démontré que la quantité et la nature des ions ajoutés au milieu d'exposition impactent fortement l'activité bactéricide des NP en écrantant les forces électrostatiques. Ainsi, à pH acide les forces électrostatiques attractives entre les NP et les bactéries sont réduites par les ions du milieu. Le degré de toxicité des NP observé est dans ce cas plus faible. A pH basique, ce sont les forces électrostatiques répulsives qui sont impactées, ce qui favorise l'adhésion des NP aux bactéries *via* les forces de Van der Waals ; induisant ainsi un degré de toxicité plus important. En raison des controverses liées aux méthodes d'évaluation de la toxicité des NP évoquées dans le chapitre précédent, plusieurs approches ont été utilisées dans notre étude (*i.e.* CFU, inhibition de croissance en milieu liquide, marquage fluorescent à l'iodure de propidium (IP)). Ces différentes approches ont donné des résultats comparables. L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN et ARN) qui ne peut pénétrer dans les bactéries que lorsque celles-ci ont perdu leur intégrité/perméabilité membranaire. Ce marquage à l'IP des cellules exposées aux NP-TiO<sub>2</sub> révèle donc un **mécanisme d'action bactéricide impliquant des dommages physiques sur l'enveloppe bactérienne pouvant conduire *in fine* à la perte de viabilité cellulaire.**

Ces travaux publiés dans *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* en 2012 (Pagnout *et al.*, 2012\*) ont permis d'établir les bases solides et nécessaires à la compréhension du rôle joué par la physicochimie du milieu d'exposition dans le degré de toxicité des NP. Ce qui a notamment contribué à une meilleure interprétation des données contradictoires précédemment publiées sur le pouvoir bactéricide des NP. Ces travaux ont également servi de référence en écotoxicologie pour le développement de nouveaux bioessais normalisés sur bactéries tenant d'avantage compte des propriétés physicochimiques singulières des NP. En effet, dans le cadre de l'évaluation de la (géo)toxicité des substances dangereuses, la majorité des bioessais bactériens (*e.g.* Microtox, Mutatox, SOS Chromotest, test d'Ames) réalisés sur NP se sont avérés négatifs alors que ceux réalisés sur eucaryotes ou lignées cellulaires ont produit des résultats en grande majorité positifs (Doak *et al.*, 2012). Plusieurs auteurs ont donc conclu à la non-validité des tests microbiens pour l'évaluation des NP et ont souligné l'importance de développer de nouveaux tests ou d'adapter/modifier les actuels (Doak *et al.*, 2012 ; Kühnel and Nickel, 2014 ; Skjolding *et al.*, 2016). Dans sa revue intitulée '*In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines*', Doak

---

\* 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 and Surfaces. B. Biointerfaces*, 92: 315-321. IF<sub>2019</sub> : 4.39 - N citations : 83.

et al. (2012) a référencé 19 études relatives à l'évaluation de la génotoxicité des NP (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et des nanotubes de carbone) via l'utilisation du test d'Ames (*Salmonella typhimurium* bacterial reverse mutation test). Sur ces 19 études, 17 ont donné des résultats négatifs et 2 ont mis en évidence un faible pouvoir mutagène des NP testées alors que les tests Micronoyaux, Comètes, et/ou *in vivo* réalisés parallèlement aux tests d'Ames se sont révélés positifs dans la majorité des cas. Le test d'Ames, développé par Bruce Ames et son équipe dans les années 1970 à l'Université de Californie à Berkeley (Ames et al., 1973) consiste à évaluer le pouvoir mutagène d'une substance chimique ou agent physique sur différentes souches de *Salmonella typhimurium* porteuses de mutations dans un gène codant la synthèse d'histidine (souches His-). Ces souches sont par conséquent incapables de croître dans un milieu carencé en histidine. En présence d'un agent mutagène la réversion de la mutation histidine peut s'opérer, permettant ainsi aux cellules de synthétiser l'histidine nécessaire à leur développement (souches devenues His+). La quantification de la fréquence de réversion (nombre de souches His+) permet d'appréhender le potentiel génotoxique de l'agent testé. Le test d'Ames est un test de référence pour bon nombre d'organisations et fait l'objet d'une ligne directrice de l'Organisation pour la Coopération et le Développement Economique (OCDE) pour les essais de produits chimiques (*Bacterial Reverse Mutation Assay OECD 471*). Ce test est couramment employé en primo-détection de l'activité mutagène des substances toxiques avant des essais de plus grande envergure sur cellules eucaryotes.

Sur la base de nos résultats antérieurs, nous avons émis l'hypothèse que les résultats obtenus lors de l'évaluation du pouvoir mutagène des NP via le test d'Ames sont des **faux négatifs résultants du manque d'interactions entre les NP et les bactéries**, et ce en raison de l'utilisation d'un milieu d'exposition inadapté à la physicochimie singulière des NP. En effet, le test d'Ames, comme la plupart des tests bactériens, est réalisé dans un milieu fortement complexant à un pH proche de la neutralité. Dans ces conditions, les interactions NP-NP sont dominantes et conduisent à l'agrégation rapide des NP au détriment des interactions NP-bactéries.

Dans ce contexte, nos travaux de recherche se sont employés à valider cette hypothèse et ont eu pour objectif d'améliorer la pertinence du test d'Ames via l'ajout d'une phase de pré-exposition favorisant les interactions électrostatiques bactéries-NP tout en limitant l'agrégation/agglomération des NP. Les expérimentations ont dans un premier temps été réalisées selon les critères de la norme OCDE (OCDE Guideline : Ames fluctuation) sur 3 types de NP-TiO<sub>2</sub> (P25 Degussa, NanoAmor, T-Lite) et sur 4 souches *S. typhimurium* présentant des mutations différentes sur le gène codant la synthèse de l'histidine (TA97a et TA98 : *GC frameshift mutations* ; TA100 : *GC base-pair substitution mutations* ; TA102 : *AT base-pair substitution mutations*). En accord avec la littérature (Warheit et al., 2007 ; Pan et al., 2010 ; Kumar et al., 2011), les tests réalisés se sont révélés négatifs pour les 3 types de NP-TiO<sub>2</sub> testées. Nous avons également démontré que lors de la phase d'exposition les NP et les bactéries sont

chargées négativement et les NP s'agrègent très rapidement lorsqu'elles sont introduites dans le milieu, formant des structures de plusieurs microns.

Afin de favoriser les interactions électrostatiques NP-bactéries et limiter l'agrégation des NP, une étape de pré-exposition en milieu faiblement salin (NaCl 10 mM, pH 5.5) a été ajoutée en amont du test normalisé. Les observations en microscopie électronique ont montré que dans ces conditions, les NP s'adsorbent à la surface des bactéries, ce qui n'était pas le cas pour le test conventionnel. L'agrégation des NP dans le milieu d'exposition a été également significativement réduite. Le test d'Ames ainsi modifié s'est révélé positif pour les 3 NP-TiO<sub>2</sub> testées. Il a également révélé une sensibilité accrue de la souche *S. typhimurium* TA102 originellement développée par Levin *et al.* (1982) pour la détection des effets mutagènes induits par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). A noter également que les analyses en microscopie électronique à transmission ont démontré l'absence d'internalisation des NP dans les bactéries. En conséquence, **la génotoxicité des NP-TiO<sub>2</sub> serait ROS-dépendante** et non liée à des interactions directes entre NP et ADN, comme cela pu être préalablement démontré pour d'autres composés mutagènes. Ces travaux de recherche ont été publiés dans *Toxicology Letters* en 2012 (Jomini *et al.*, 2012\*) et ont également fait l'objet d'un article méthodologique en 2014 (Pagnout *et al.*, 2014\*\*).

### **2.3.2. Mécanismes d'action des NP sur les bactéries**

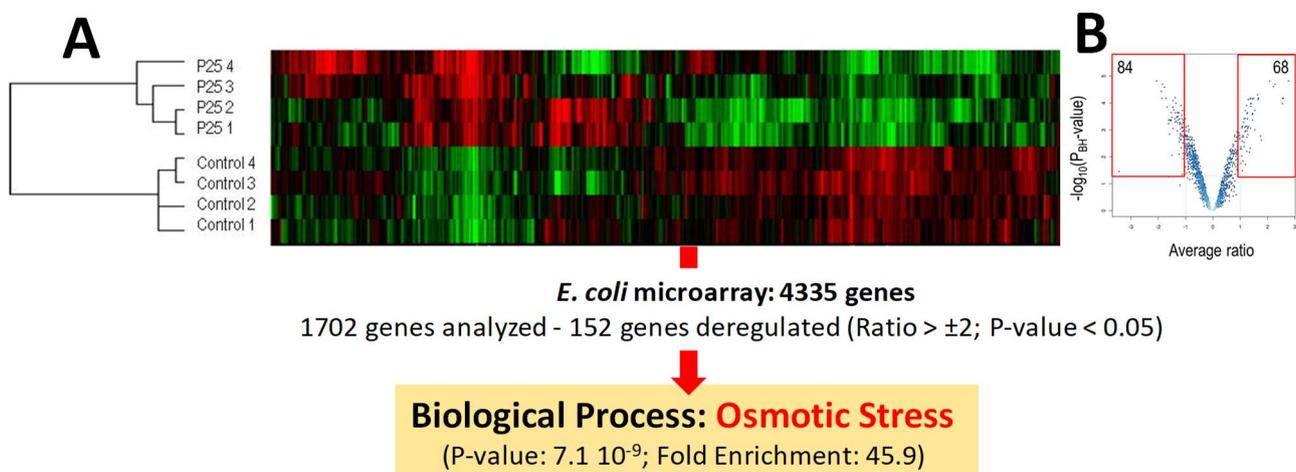
Ces travaux de recherche relatifs à la compréhension des mécanismes d'action bactéricides des NP ont été initiés en 2012. La littérature existante sur le sujet, majoritairement soutenu par la recherche R&D en génie des procédés et traitement de l'eau, était principalement dédiée à l'activité photocatalytique des NP-TiO<sub>2</sub> et NP-ZnO sous exposition UV. Il a été démontré que le mécanisme de toxicité principal implique la génération d'espèces réactives de l'oxygène (stress oxydatif) responsables, entre autre, de lésions membranaires et dommages à l'ADN délétères pour les bactéries (Cheng *et al.*, 2007 ; Ibanez *et al.*, 2003). Nos précédent travaux (Pagnout *et al.*, 2012), ainsi que ceux de Jiang *et al.* (2009) et Fenoglio *et al.* (2009) ont cependant mis en évidence qu'en l'absence d'irradiation UV et dans des conditions de physicochimie de milieu favorisant les interactions NP-bactéries, les NP-TiO<sub>2</sub> (NP non-solubles) pouvaient également avoir une activité

---

\* Jomini S., Labille J., Bauda P., Pagnout C., 2012. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215 (1): 54-61. IF<sub>2019</sub> : 3.57 - N citations : 36.

\*\* Pagnout C., Jomini S., Bauda P., 2014. Revised procedure of the bacterial reverse mutation test for genotoxic evaluation of nanoparticles, Chapter 3. In/ *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, eds L. María Sierra; I Gaivão, Springer New York - DOI: 10.1007/978-1-4939-1068-7\_3. ISBN: 978-1-4939-1068-7.

bactéricide importante. Cette observation laisse donc présager l'existence d'un mécanisme de toxicité additionnel n'impliquant pas la génération de ROS. Nous avons également démontré que le degré de toxicité est directement corrélé à la quantité de NP adsorbées sur les surfaces bactériennes (Pagnout *et al.*, 2012). Des observations similaires ont été rapportées sur des échantillons contrôles non-irradiés lors d'études sur la photocatalyse du TiO<sub>2</sub> (Jiang *et al.*, 2009). Nous avons ainsi formulé deux hypothèses pour tenter d'expliquer ces résultats : (1) la toxicité serait due à un stress oxydatif induit par les NP, et ce même en l'absence d'irradiation des NP-TiO<sub>2</sub> et/ou (2) la toxicité serait liée à une action mécanique des NP sur la surface bactérienne (*e.g.* abrasion, perforation, rupture de la membrane) responsable de lésions irréversibles et délétères pour la cellule bactérienne.

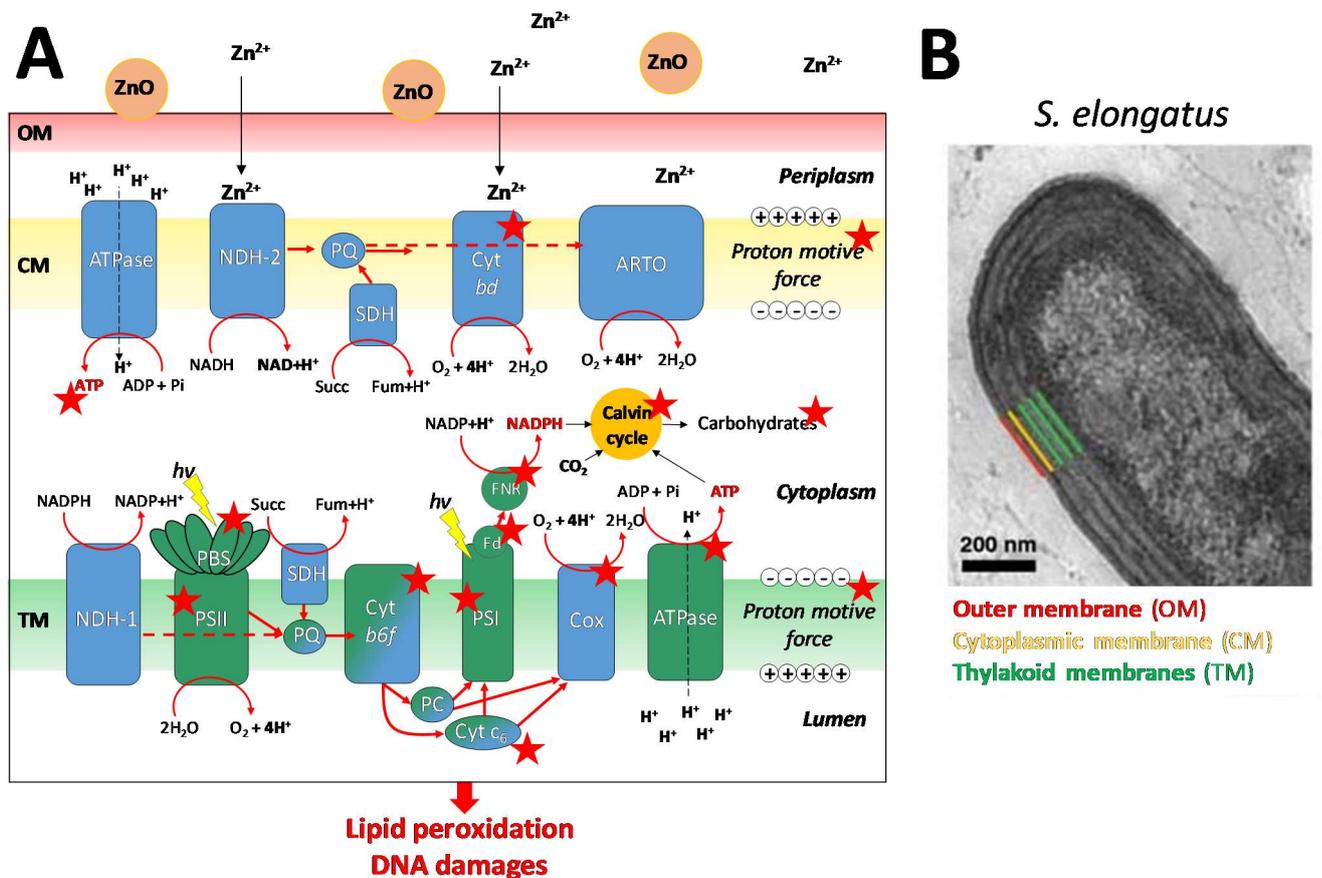


**Figure 4.** Données transcriptomiques (puces ADN) obtenues sur *E. coli* exposée aux NP-TiO<sub>2</sub> P25 (Degussa). **A.** Heat Map après filtration des données (vert : gènes surexprimés ; rouge : gènes sous-exprimés). **B.** Volcano Plot des ratios moyens.

Dans la continuité des travaux précédemment décrits, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes d'action bactéricides des NP-TiO<sub>2</sub> P25 (Evonik Degussa) sur la souche modèle *Escherichia coli* MG1655. Plusieurs approches complémentaires en cytométrie de flux, biologie moléculaire (puces ADN, RT qPCR), protéomique (2D DIGE) et biochimie (dosage des cations intracellulaires et de l'ATP) ont été mises en œuvre pour appréhender ce mécanisme dans sa globalité. Les résultats de notre étude publiée en 2015 dans *Proteomics* (Sohm *et al.*, 2015\*) ont mis en évidence que l'adsorption des NP-TiO<sub>2</sub> sur la surface bactérienne induit (i) une perte du potentiel de membrane (marquage des cellules au DiBAC<sub>4</sub>(3)), nécessaire à de nombreux processus physiologiques élémentaires comme par exemple la respiration cellulaire ou le transport de molécules d'intérêts ; (ii)

\* Sohm B., Immel F., Bauda P., Pagnout C., 2015. Insight into the primary mode of action of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics*, 15(1): 98-113. IF<sub>2018</sub> : 3.25 - N citations : 58

une perte d'intégrité/perméabilité membranaire (marquage des cellules à l'iodure de propidium) conduisant à une fuite des ions  $K^+$  et  $Mg^{2+}$  intracellulaires et à l'entrée d'ions présents dans le milieu d'exposition (dosages intracellulaires des ions), et (iii) une baisse du niveau d'ATP intracellulaire (dosage intracellulaire). Assez logiquement, la réponse cellulaire majeure révélée par nos approches transcriptomique est équivalente à celle d'un **stress osmotique (Fig. 4)**. L'absence de dérégulation significative des gènes impliqués dans la synthèse des enzymes antioxydantes ou même encore de ces mêmes enzymes (approches protéomiques) nous ont conduit à **rejeter l'hypothèse d'un stress oxydatif** comme mécanisme d'action bactéricide primaire des NP-TiO<sub>2</sub>.

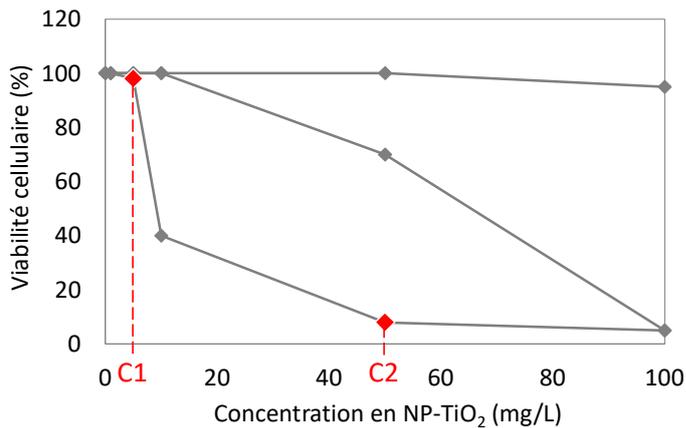


**Figure 5. A.** Représentation schématique des mécanismes d'action des NP-ZnO sur la cyanobactérie modèle *Synechococcus elongatus* PCC 7942. En vert les enzymes impliquées dans la photosynthèse, en bleu les enzymes impliquées dans la respiration cellulaire et en vert/bleu les enzymes intervenant dans les deux processus. OM: outer membrane; CM: cytoplasmic membrane; TM: thylakoid membrane; PSI and PSII: photosystem I and II; PBS: phycobilisome; PQ: plastoquinone; PC: plastocyanin; Fd: ferredoxin; FNR: ferredoxin-reductase; Cyt c<sub>6</sub>: cytochrome c<sub>6</sub>; NDH-1 and NDH-2: NAD(P)H dehydrogenase 1 and 2; SDH: succinate dehydrogenase; Cyt b<sub>6</sub>f: cytochrome b<sub>6</sub>f complex; Cox: cytochrome c oxidase; ARTO: alternative respiratory terminal oxidase; Cyt bd: cytochrome bd-quinol oxidase. Les étoiles rouges indiquent les éléments dont la synthèse est impactée par l'exposition aux NP-ZnO. **B.** Photo en microscopie électronique d'une coupe de *Synechococcus elongatus* PCC7942 montrant les différentes membranes.

Plus récemment, dans le cadre de l'ANR P2N Mesonnet (2011-2014), nos travaux de recherche se sont inscrits dans un contexte environnemental plus réaliste avec notamment l'évaluation de la toxicité de filtres solaires nanoparticulaires sur la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 et l'étude de leurs mécanismes d'action bactéricides. Les nanomatériaux testés étaient les Z-COTE® (NP-ZnO non enrobée) et les Z-COTE HP1® (NP-ZnO enrobée d'une couche de triéthoxycaprylylsilane), tous deux produits par BASF et communément retrouvés dans les crèmes solaires haute protection. Les effets associés à la forme ionique du zinc ont également été évalués lors de cette étude. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une dissolution rapide du Z-COTE® ( $\pm 80\%$  en 1 h) dans le milieu d'exposition (eau de synthèse), et une cinétique plus lente pour le Z-COTE HP1® ( $\pm 60\%$  en 5h) en raison de la stabilité de son enrobage organique. Les analyses transcriptomiques (puces ADN) réalisées après 5h d'exposition sont en accord avec ces observations et ont clairement mis en évidence le **rôle prépondérant des ions Zn dans les effets toxicologiques observés, et ce malgré l'adsorption rapide des NP sur la surface bactérienne** révélée par microscopie hyperspectrale. Les analyses transcriptomiques couplées à la cytométrie de flux après marquage des cellules au DiBAC<sub>4</sub>(3) (potentiel de membrane), SYTOX green (perméabilité membranaire), et BODIPY (peroxydation lipidique) ont mis en évidence que les ions Zn dissipent le potentiel de membrane nécessaire à la photosynthèse et à la respiration cellulaire et induit un stress conduisant à une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN (**Fig. 5**). Plus globalement, cela entraîne la dérégulation des photosystèmes I et II, de la phosphorylation oxydative et des mécanismes de transcription/traduction. En toute logique, cela se traduit par une baisse significative de la concentration intracellulaire en ATP et l'inhibition de la croissance cellulaire. A noter cependant qu'aucune baisse significative de la concentration en pigments (chlorophylle A, caroténoïdes, phycocyanine, allophycocyanine) n'a été observée. En ce qui concerne les enzymes impliquées dans le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène, l'analyse transcriptomique a révélé une dérégulation des gènes codant pour la catalase-peroxydase, la thioredoxin, la glutaredoxine, la rubrerythrine, la glutathion peroxydase suite à l'exposition au Zn ionique et aux NP-ZnO. Seul le gène codant la superoxide dismutase, enzyme impliquée dans l'élimination des O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a montré un niveau d'expression supérieur en présence exclusive des deux nanomatériaux. Ces travaux ont été publiés en 2019 dans la revue *Environmental Science and Pollution Research* (Vicente *et al.*, 2019\*).

---

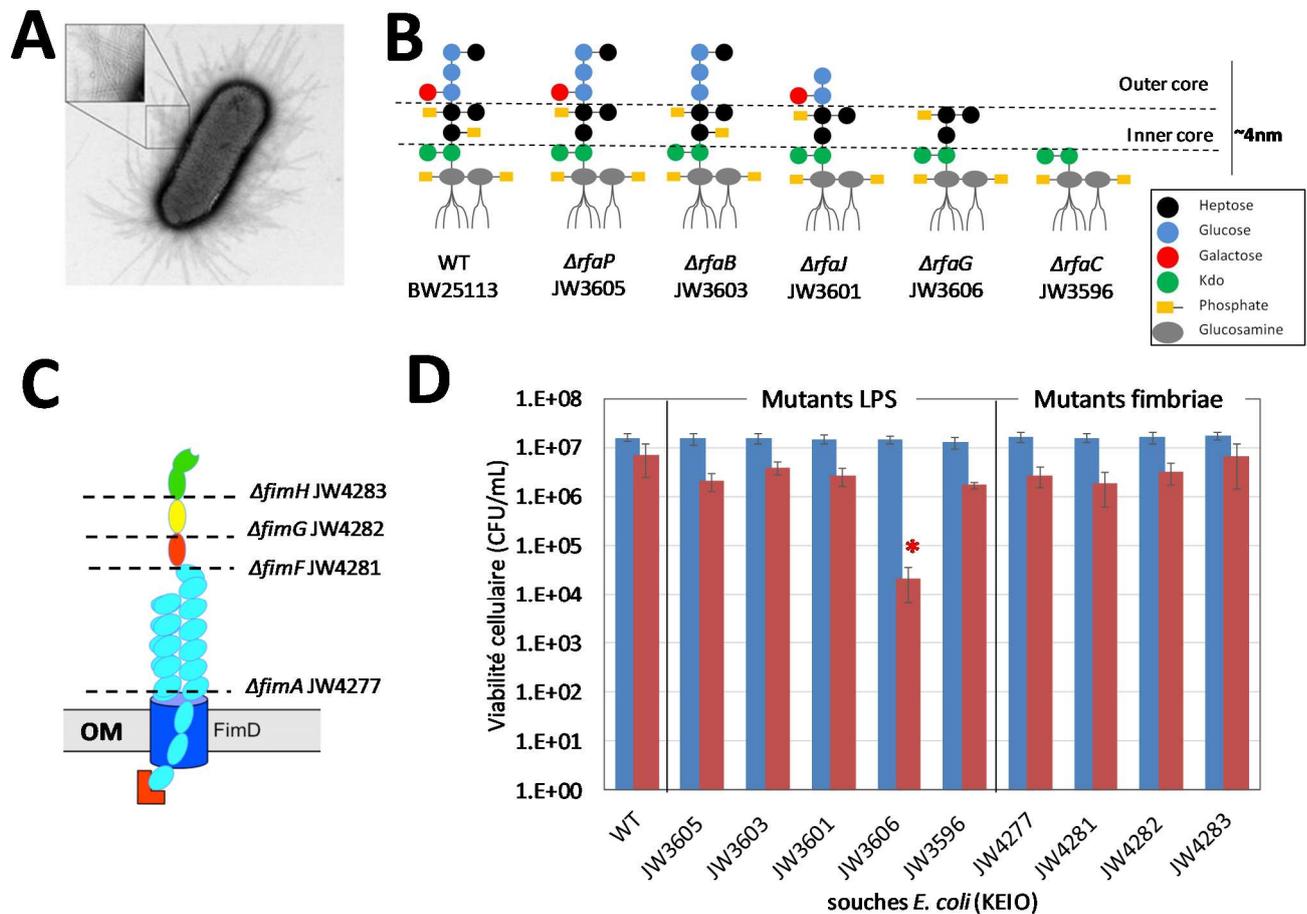
\* Vicente A., Sohm B., Flayac J., Rousselle P., Bauda P., Pagnout C., 2019. Toxicity mechanisms of ZnO UV-filters used in sunscreens toward the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 22450-22463. IF<sub>2019</sub> : 3.06 – N citations : 2



**Figure 6.** Effet de la concentration en cellules ( $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  cellules par mL) sur la toxicité (estimée en CFU) des NP-TiO<sub>2</sub>. En rouge les concentrations seuils critiques au-delà desquelles (C1) les bactéries ne sont plus en mesure de contrer les effets délétères des NP et (C2) l'augmentation de la concentration en NP n'a plus d'effet sur le pourcentage de cellules viables.

Le couplage de plusieurs approches expérimentales sur deux bactéries modèles nous ont permis d'appréhender les mécanismes d'action bactéricides des NP-TiO<sub>2</sub> (NP non-solubles) et des NP-ZnO (NP solubles). **Dans le cas des NP-TiO<sub>2</sub>**, la phase d'adsorption des NP sur la membrane bactérienne est une condition inhérente à la toxicité. Cette adsorption et les effets délétères qui en découlent sont modulés par la physicochimie du milieu d'exposition. Les NP induisent alors la déstabilisation de la membrane qui, en laissant entrer l'eau et fuiter les ions intracellulaires, n'assure plus son rôle de barrière semi-perméable. Cela se traduit au niveau cellulaire par un **stress osmotique majeur** conduisant *in fine* à une **perte de viabilité cellulaire**. A notre connaissance, ce mécanisme d'action des NP n'avait jusqu'alors jamais été documenté. Nos travaux ont également démontré que la perte de viabilité cellulaire n'est pas linéairement corrélée à la concentration en NP-TiO<sub>2</sub> et qu'il existe deux concentrations seuils critiques au-delà desquelles 1) les bactéries ne sont plus en mesure de contrer les effets délétères des NP-TiO<sub>2</sub> (concentration C1) et 2) l'augmentation de la concentration en NP-TiO<sub>2</sub> n'a plus d'effet significatif sur la perte de viabilité (concentration C2) (**Fig. 6**). Ces concentrations seuils sont intimement dépendantes de la densité bactérienne dans le milieu ou pour être plus précis du ratio Surface bactéries / Surface NP (**Fig. 6**). Pour C2, le pourcentage de cellules viables se situe aux alentours de 3-7%, ce qui signifie par conséquent qu'une proportion non négligeable de la population bactérienne n'est pas/plus impactée par les effets délétères des NP-TiO<sub>2</sub> aux concentrations les plus fortes. Nous reviendrons sur ce point dans la suite du présent document (**Chap. 2.3.3 & 3.1**). **En ce qui concerne les NP-ZnO** manufacturées, leur dissolution rapide dans le milieu d'exposition ne nous a pas permis de mettre en évidence un quelconque effet 'nano' dans les conditions d'exposition utilisées, et la toxicité mesurée semble directement corrélée à la biodisponibilité des ions Zn libérés dans le milieu par les NPs.

### 2.3.3. Rôle de l'interphase bactérienne dans la toxicité des NP



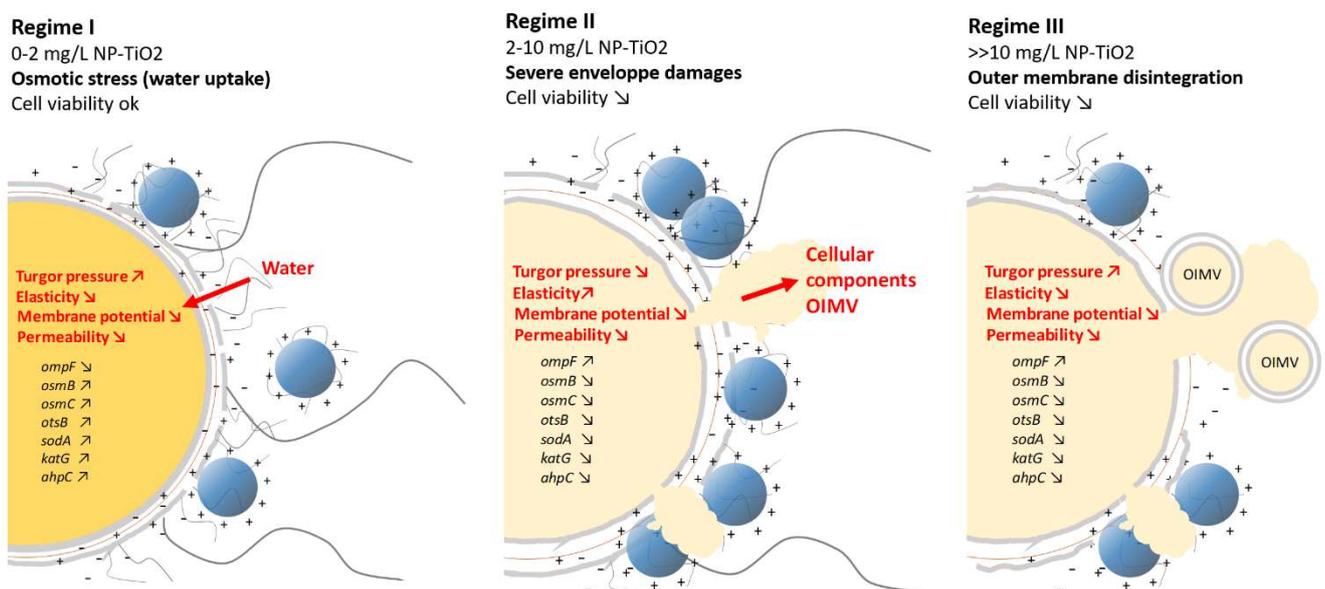
**Figure 7.** A. Photographie prise en microscopie électronique mettant en évidence les fimbriae (source Hahn et al., 2012) présents sur la surface d'*E. coli*. B. Représentation schématique des LPS et des différents tronçages résultant des mutations *rfa* (mutants KEIO). C. Représentation schématique des fimbriae de type I et des différents tronçages résultant des mutations *fim* (mutants KEIO). D. Effet des NP-TiO<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire de la souche sauvage BW25113 (WT) et des mutants *rfa* et *fim* (en bleu les cellules non exposés et en rouge les cellules exposées aux NP-TiO<sub>2</sub>).

Nos précédents travaux ont démontré que l'adsorption des NP-TiO<sub>2</sub> sur la surface bactérienne induit une perte d'intégrité membranaire conduisant *in fine* à la mort cellulaire. De ce fait, les propriétés structurales, physiques et/ou physicochimiques de l'enveloppe bactérienne sont susceptibles d'impacter (i) la phase d'approche des NP vers la surface bactérienne, (ii) leur d'adsorption et (iii) leur action physique sur la membrane (*i.e.* abrasion, perforation, disruption), conduisant à des degrés de résistance/sensibilité variables d'une souche à une autre. Ceci peut notamment expliquer les différences de sensibilité aux NP communément observées entre les bactéries Gram négatives et les Gram positives (Slavin et al., 2017). De par la composition et la complexité de leur enveloppe (*i.e.* deux membranes délimitant un espace périplasmique contenant

une faible épaisseur (1-7 nm) de peptidoglycane), les bactéries Gram négatives présentent un niveau de sensibilité aux NP plus élevé que celui observé pour les bactéries Gram positives (une seule membrane et une épaisse couche (20-80 nm) de peptidoglycane). Les bactéries Gram négatives possèdent également à leur surface un grand nombre de lipopolysaccharides (LPS) et fimbriae impliqués notamment dans les mécanismes d'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques (**Fig. 7 A**). Ces composants de l'enveloppe bactérienne sont donc les premiers à interagir avec les NP présentés dans le milieu d'exposition et leur abondance, composition, propriétés physicochimiques sont donc susceptibles d'influer la sensibilité des souches.

Nos travaux initiés en 2012 dans le cadre d'un projet inter-laboratoire OTELO (LIEBE + LEM = ex. laboratoire LIEC) avaient donc pour objectif d'appréhender le rôle joué par l'interphase bactérienne sur l'activité bactéricide des NP. Dans la continuité des travaux présentés au **chapitre 2.3.1**, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action des NP-TiO<sub>2</sub> (P25 Degussa) sur la souche *Escherichia coli* BW25113 et sur des mutants de cette même souche présentant des LPS ou des fimbriae de compositions et longueurs variables (mutants *rfa* et *fim* KEIO) (**Fig. 7 B et C**). Les résultats des expositions aux NP-TiO<sub>2</sub> ont révélé le **rôle non déterminant de la présence/absence des LPS et fimbriae dans la sensibilité aux NP** (WT vs. JW3596 et WT vs. JW4277) (**Fig. 7 D**). Ils ont cependant mis en évidence une sensibilité accrue de la souche mutante *E. coli* JW3606 ( $\Delta rfaG$ ) aux NP comparativement à la souche sauvage et aux autres mutants testés (2 log de différence). Nos travaux se sont donc intéressés aux déterminants de cette toxicité en se focalisant sur les propriétés structurales, physicochimiques et nanomécaniques des interphases bactériennes. L'analyse bibliographique a mis en évidence une singularité particulière des mutants *rfa*, et plus particulièrement des mutants *rfa* présentant des LPS tronqués au niveau de leur région interne (*inner-core truncated LPS*). En effet, ce tronçage induit des effets pléiotropes pouvant conduire, entre autre, à une réduction du nombre de protéines présentes sur la membrane externe (*outer membrane proteins, OMP*), une altération du phénotype de résistance/sensibilité à divers antibiotiques, détergents, bactériophages et un effet sur les propriétés d'adhésion de la souche sur les surfaces abiotiques (Schnaitmann et Klena, 1993 ; Nikaido, 2003 ; Wang *et al.*, 2015). Ce phénotype plus connu sous le nom *deep-rough phenotype* a fait l'objet d'une littérature abondante ces 20 dernières années. Cependant, par manque de caractérisation de ces mutants, ces études sont pour la plupart très descriptives et fortement spéculatives. L'utilisation d'approches expérimentales originales et complémentaires (iTRAQ pour la protéomique, AFM pour la nanomécanique, et la microélectrophorèse pour l'électrocinétique) nous a permis d'apporter des éléments de réponse concrets sur les relations existantes entre propriétés de l'interphase et le phénotype *deep-rough*. Ces travaux récemment publiés dans *Scientific Reports*

(Pagnout *et al.*, 2019\*) ont révélé une hétérogénéité importante dans la distribution spatiale du module d'Young et de la rigidité de l'interphase, symptomatique d'une altération de l'intégrité membranaire sur les deux mutants *deep-rough* testés (JW3596 et JW3606). L'analyse quantitative des OMP a quant à elle mis en évidence une baisse significative de plusieurs protéines (BtuB, FhuA, FepA, OmpW) impliquées dans les mécanismes de reconnaissance/attachement des bactériophages et de divers composés antibactériens (*e.g.* collicine, albomycine, rifamycine, microcine). Cependant les différences observées entre les mutants *deep-rough* testés sont peu significatives et ne permettent pas d'expliquer à elles seules les phénotypes de sensibilité/résistance aux NP-TiO<sub>2</sub> observés (*i.e.* JW3606 sensible vs. JW3596 résistante).



**Figure 8.** Représentation schématique des effets induits par les NP-TiO<sub>2</sub> à différentes concentrations sur la souche modèle *E. coli* JW3606. Régime I : entrée d'eau dans la cellule ; Régime II : fuite d'éléments intracellulaires ; Régime III : désintégration de la membrane externe.

Des analyses complémentaires (AFM, électrocinétique, cytométrie et qPCR) ont été réalisées sur les souches JW3606 et JW3596 exposées à une gamme croissante de NP-TiO<sub>2</sub>. Pour la souche JW3606 sensible aux NP, ces analyses ont révélé **trois régimes distincts de réponse en fonction de la concentration en NP testée (Fig. 8, Annexe 1)** :

**Régime I** : Aux plus faibles concentrations (*i.e.* < 2 mg/L), les bactéries sont soumises à un phénomène d'abrasion par les NP (*i.e.* altération de l'interphase) conduisant à une perte de perméabilité

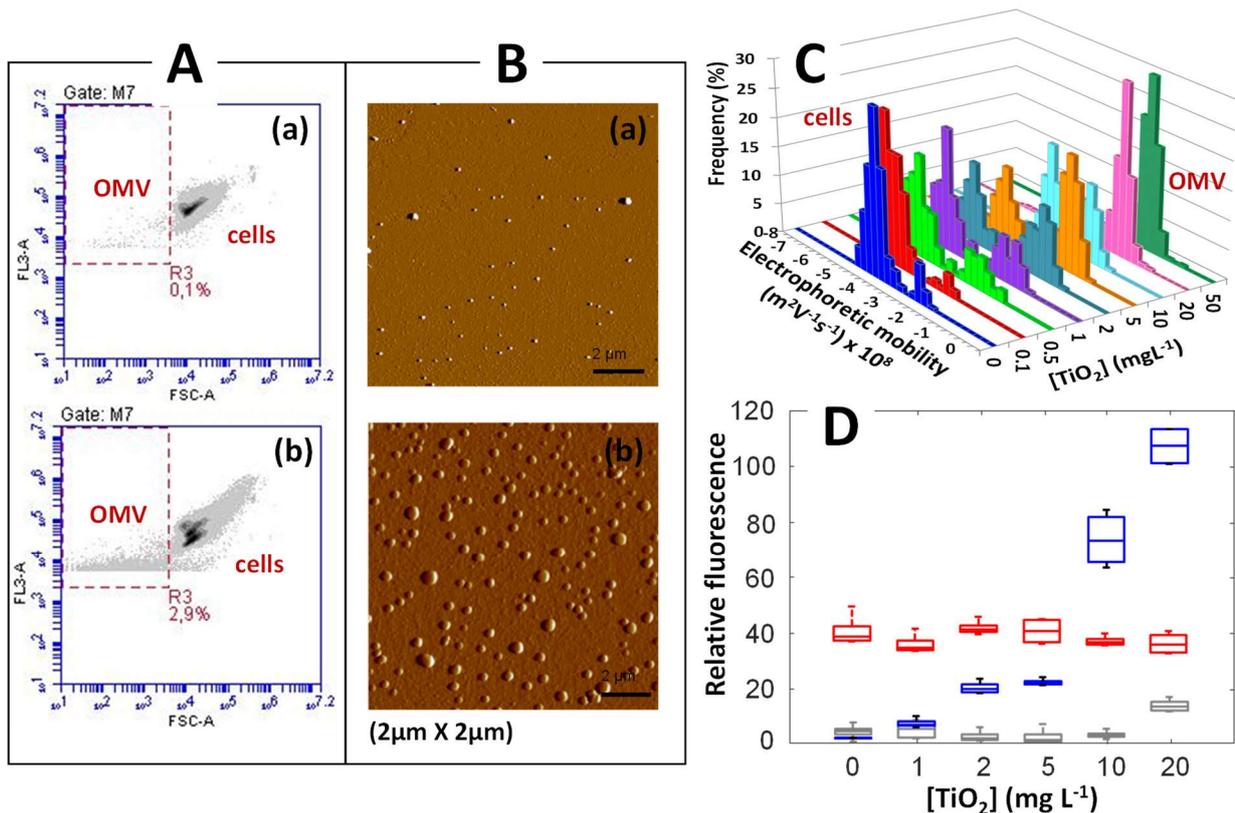
\* Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre E., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L., 2019. Pleiotropic effects of *rfa*-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Scientific Reports* 9(1):9696. IF<sub>2019</sub> : 3.99 – N citations : 9

membranaire (marquage des cellules au DIBAC et à l'iodure de propidium) et à un transfert osmotique d'eau dans les cellules (augmentation de la pression de turgescence et perte d'élasticité membranaire). En accord avec nos précédents résultats, cela se traduit au niveau moléculaire par l'activation d'un mécanisme de réponse équivalent à celui d'un stress osmotique avec la dérégulation de nombreux gènes impliqués dans le maintien de l'équilibre osmotique (*ompF*, *osmB*, *osmC*, *otsB*). Plusieurs gènes impliqués dans le mécanisme de réponse au stress oxydatif sont également surexprimés (*sodA/B/C*, *katG*, *ahpC*). Le mécanisme d'induction de ces gènes peut être lié à la production de ROS par les NP-TiO<sub>2</sub>, comme cela a pu être mis en évidence par Leug *et al.* (2016) (production de radicaux OH<sup>\*</sup>) et/ou au stress osmotique induit par l'action physique des NP. Il existe en effet un lien direct entre les mécanismes de réponse au stress osmotique et oxydatif avec de nombreux gènes induits de manière analogue par les deux types de stress (Gunasekera *et al.*, 2008 ; Drejer, 2015 ; Bojanovic *et al.*, 2017). Ces différents aspects seront développés et discutés dans le **Chapitre 3.1.**

**Régime II :** Aux concentrations comprises entre 2 et 10 mg/L de NP-TiO<sub>2</sub>, on observe un effondrement de la pression de turgescence et l'augmentation de l'élasticité membranaire. Ce phénomène est caractéristique d'une profonde altération de la membrane cytoplasmique et de la fuite d'éléments intracellulaires dans le milieu d'exposition (*e.g.* K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> comme nous l'avons précédemment démontré dans Sohm *et al.*, 2015). On observe en toute logique une forte augmentation de la perméabilité membranaire et une baisse significative de la capacité des bactéries à se diviser et à former des colonies sur milieu gélosé (*Colony Forming Unit* – CFU). Au niveau moléculaire on observe une modification radicale de l'expression des gènes impliqués aussi bien dans le stress osmotique qu'oxydatif. L'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation membranaire, comme *oppA* et *oppB* (synthèse du peptidoglycane) ou *lpxA* (synthèse des lipides) est également altérée.

**Régime III :** Pour les concentrations en NP-TiO<sub>2</sub> les plus extrêmes (10-20 mg/L), on observe en AFM une ré-augmentation de la rigidité membranaire due probablement à un effet de contact/interaction pointe AFM – peptidoglycane en raison d'une profonde altération de la membrane externe. A ces mêmes concentrations, les expérimentations en cytométrie de flux montrent également une baisse significative du nombre d'événements 'bactéries' lié à des phénomènes d'hétéro-agrégation NP-bactéries et/ou de la lyse cellulaire. Les analyses en cytométrie de flux révèlent également l'augmentation très significative du nombre d'évènements de petites tailles (<<1 μm) marqués au FM4-64 (marquage des lipides) et au Syto9 (marquage des ADN/ARN) (**Figure 9 A**). Des analyses complémentaires en AFM et électrocinétique ont défini ces événements comme étant des vésicules membranaires de type OMV (*outer membrane vesicles*) (Toyofuku *et al.*, 2019) (**Fig. 9 B, C**). Nos travaux

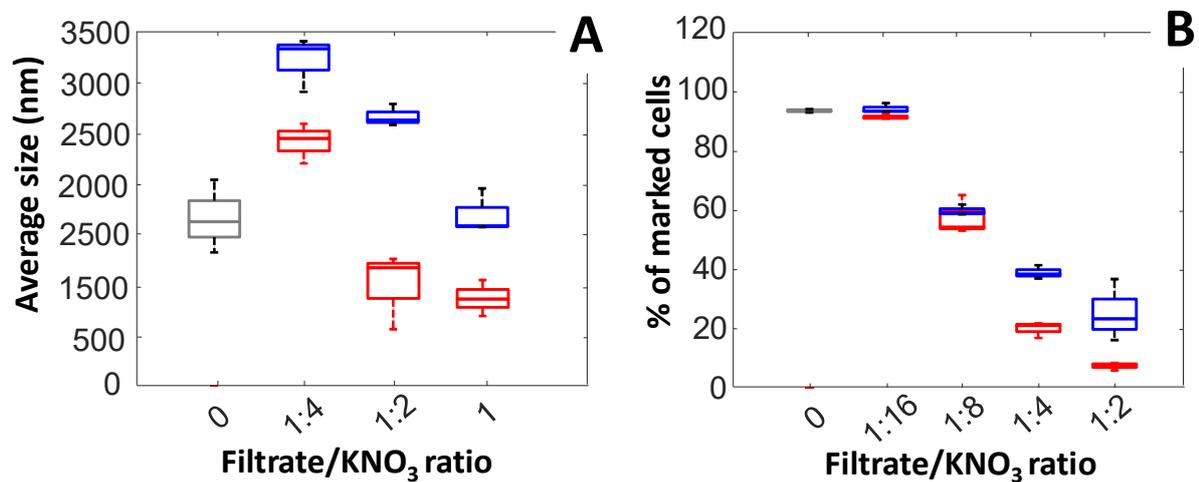
ont également mis en évidence (i) pour la souche JW3606 (sensible aux NP) une **augmentation croissante de la quantité d'OMV avec la concentration en NP-TiO<sub>2</sub>** (Fig. 9 D), ce qui n'est pas le cas pour la souche JW3596 (résistante aux NP) et la souche sauvage *E. coli* BW25113 (WT) et (ii) pour la souche JW3596 (résistante aux NP), comparativement aux souches JW3606 et la WT, un **phénotype d'hypervésiculation**, et ce même en l'absence de NP-TiO<sub>2</sub> (Fig. 9 D).



**Figure 9. A.** Mise en évidence par cytométrie de flux des événements marqués au Syto9 (OMV et cellules) suite à l'exposition de la souche JW3606 (sensible aux NP) à 0 mg/L (=contrôle) (a) et à 20 mg/L (b) de NP-TiO<sub>2</sub>. **B.** Images AFM réalisées sur le filtrat (0,45 µm) de la suspension bactérienne JW3606 après exposition à 0 mg/L (contrôle) (a) et 20 mg/L (b) de NP-TiO<sub>2</sub>. **C.** Analyses de mobilité électrophorétique réalisée sur la suspension bactérienne JW3606 exposée à différentes concentrations de NP-TiO<sub>2</sub>. **D.** Analyses spectrofluorimétriques des filtrats (0,45 µm) obtenus après exposition des souches JW3606 (en bleu), JW3596 (en rouge) et la souche sauvage BW25113 (en gris) à différentes concentrations de NP-TiO<sub>2</sub>.

Ces différents résultats nous ont donc logiquement amené à nous interroger sur le **rôle joué par les OMV dans le mécanisme de résistance/défense des bactéries aux nanoparticules**. Les dommages membranaires et le stress osmotique associé suite à l'exposition aux NP-TiO<sub>2</sub> induirait un mécanisme d'hypervésiculation. Ce qui, par augmentation de la surface de contact OMV-NP limiterait les interactions cellules-NP et donc la toxicité qui en résulte. Cette hypothèse expliquerait d'une part les

effets dose-réponse non linéaires communément observés lorsqu'on évalue la toxicité des NP sur les bactéries (et plus particulièrement la concentration seuil C2, **Fig. 6**), mais également le phénotype de résistance aux NP-TiO<sub>2</sub> observé pour la souche JW3596 (*i.e.* hypervésiculation en l'absence de NP). Nos précédents travaux ont mis en évidence que contrairement aux autres souches testées, la souche JW3596 dépourvue de LPS est naturellement soumise à un profond stress osmotique et oxydatif dans le milieu d'exposition (KNO<sub>3</sub> 10 mM) (Pagnout *et al.*, 2019 ; **Annexe 1**). L'absence de LPS et le stress physiologique que cela peut induire sur la souche conduirait à un phénotype d'hypervésiculation (effet pléiotrope de la mutation *rfaC*) et donc indirectement à la résistance de la souche aux NP-TiO<sub>2</sub>. Le lien entre ce phénotype d'hypervésiculation et la résistance à divers agents biocides a récemment été mis en évidence par plusieurs auteurs dans le cadre d'études sur les antibiotiques et les bactériophages (Manning and Kuehn, 2011 ; Manning and Kuehn, 2013 ; Kulkarni *et al.*, 2014 ; Kulkarni *et al.*, 2015 ; Reyes-Robles *et al.*, 2018 ; Murray *et al.*, 2020). **Les OMV joueraient le rôle de leurre** ('*act as decoys / baits*') en séquestrant (adsorption et/ou absorption) ces différents éléments biocides, ce qui limiterait le degré d'exposition des cellules. Dans le cadre de l'exposition des bactéries aux NP-TiO<sub>2</sub>, nos récents résultats ont clairement mis en évidence (*i*) le fort degré d'interaction OMV-NP dans le milieu d'exposition (**Fig. 10 A**) et (*ii*) le rôle protecteur des OMV pour les bactéries vis-à-vis des effets délétères des NP (**Fig. 10 B**), expliquant ainsi les différents phénotypes de sensibilité/résistance aux NP-TiO<sub>2</sub> des deux mutants *deep-rough* testés (JW3596 et JW3606).



**Figure 10. A.** Taille moyenne des agrégats mesurés après 15 minutes de coincubation des NP-TiO<sub>2</sub> (50 mg/L) et des OMV à différentes concentrations (ratio filtrat/KNO<sub>3</sub>). En gris la condition sans OMV, en bleu les OMV provenant de la souche JW3606 et en rouge celles provenant de la souche JW3596. **B.** Effet des OMV à différentes concentrations (ratio filtrat/KNO<sub>3</sub>) sur la toxicité des NP-TiO<sub>2</sub> (50 mg/L) sur la souche JW3606 (sensible aux NP). La toxicité est évaluée en cytométrie de flux par marquage des cellules à l'iodure de propidium (perméabilité membranaire). Le code couleur est similaire à celui précédemment détaillé.

L'exposition de mutants *E. coli* présentant des LPS de compositions et tailles variables à des concentrations croissantes de NP-TiO<sub>2</sub>, et l'utilisation d'approches expérimentales multiples et complémentaires, nous a permis de mettre en évidence des mécanismes de réponse bactériens aux nanoparticules totalement nouveaux. Pour la souche JW3606 sensible aux NP-TiO<sub>2</sub>, 3 types de réponses (3 régimes) en fonction de la concentration en NP-TiO<sub>2</sub> présente dans le milieu d'exposition et du degré d'altération de l'enveloppe cellulaire, ainsi qu'un mécanisme de vésiculation NP-dépendant. Pour la souche JW3596 un mécanisme de résistance OMV-dépendant capable de contrer les effets délétères des NP-TiO<sub>2</sub> sur les cellules. Ces travaux ont été récemment soumis à publication dans *Nature Communications*\* et sont décrits plus en détail en **Annexe 1**.

#### **2.3.4. Effets des NP à l'échelle de la communauté bactérienne**

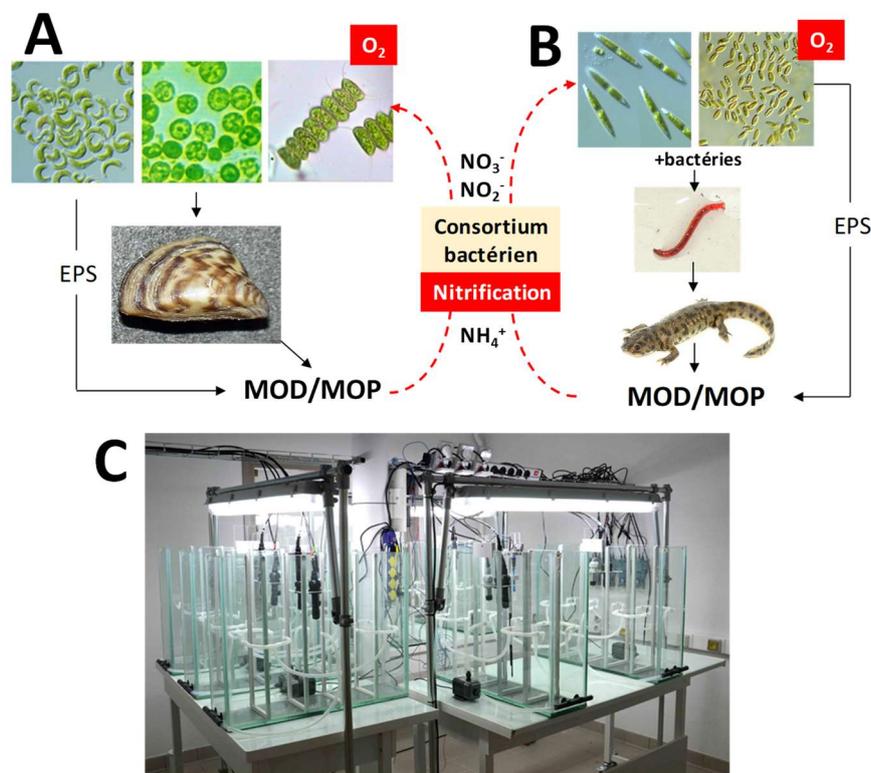
Nos précédents travaux se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes d'action bactéricides des NP-TiO<sub>2</sub> et des différents facteurs susceptibles de moduler ces effets (*i.e.* paramètres physicochimiques du milieu, nature/propriétés de l'interphase bactérienne). Pour ce faire, différentes approches expérimentales ont été développées sur organismes modèles aux échelles cellulaires et populationnelles. Dans un contexte plus large d'évaluation du risque environnemental, nous nous sommes également intéressés aux effets des NP-TiO<sub>2</sub> (P25 Degussa) sur des communautés bactériennes naturelles provenant de la rivière Moselle. Les expositions réalisées en systèmes batch (exposition en triplicats à 0, 1, 10, 100 mg/L de NP-TiO<sub>2</sub>), à l'obscurité, sur une durée de 2 semaines ont mis en évidence un effet des NP-TiO<sub>2</sub> sur l'abondance des bactéries planctoniques (3x plus de cellules dans les échantillons exposés par rapport aux contrôles) et sessiles (7x moins de cellules dans les échantillons exposés par rapport aux contrôles) à la plus forte concentration en NP. Les NP-TiO<sub>2</sub> pourrait donc avoir un effet sur le processus d'adhésion des bactéries sur les surfaces abiotiques, ce qui est en accord avec nos précédents résultats sur bactéries modèles ayant mis en évidence les effets délétères des NP-TiO<sub>2</sub> sur l'enveloppe bactérienne (*i.e.* altération de l'interphase). Nos travaux ont également mis en évidence un effet des NP-TiO<sub>2</sub> aux différentes concentrations testées sur la structure des communautés bactériennes planctoniques et sessiles (analyses DGGE). Le séquençage des ADNr 16S a révélé un impact négatif des NP-TiO<sub>2</sub> sur l'abondance en *Betaproteobacteria*, et plus particulièrement sur les bactéries appartenant à la famille des *Comamonadaceae* (genre *Comamonas*), et un impact positif sur l'abondance en *Bacteroidetes*, notamment sur les bactéries appartenant à la

---

\* Pagnout C., Razafitianamaharavo A., Sohm B., Caillet C., Beaussart A., Delatour E., Bihannic I., Offroy M., Duval J.F.L., *Osmotic stress and vesiculation as key mechanisms controlling bacterial sensitivity and resistance to TiO<sub>2</sub> nanoparticles*. Soumis à *Nature Communications*.

famille des *Cytophagaceae* (genre *Emticia*). Ces mêmes observations ont été réalisées sur les communautés planctoniques et sessiles.

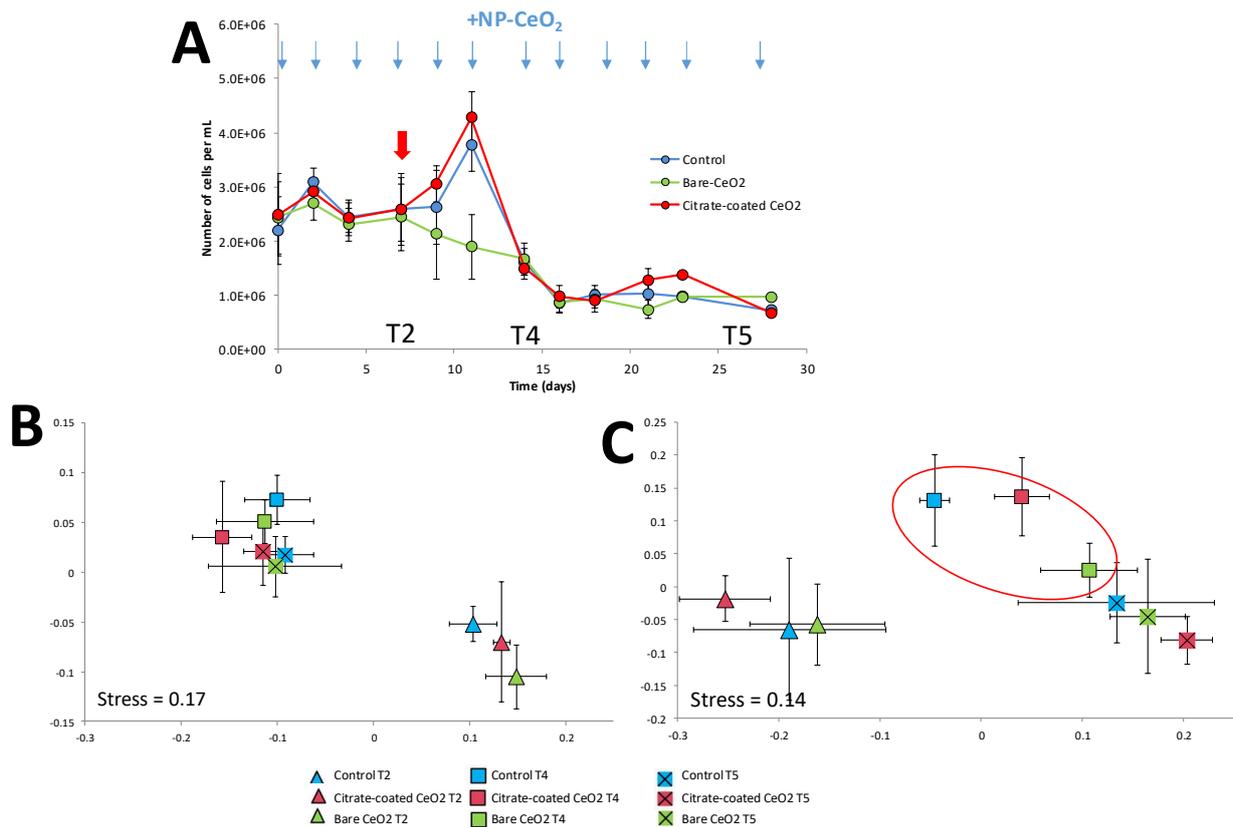
Les résultats de cette étude publiés en 2015 dans *Environmental Pollution* (Jomini *et al.*, 2015\*) sont majoritairement descriptifs et restent malheureusement peu explicatifs des phénomènes observés. En effet, sur la base de ce que nous connaissons du mécanisme d'action des NP-TiO<sub>2</sub>, la bibliographie actuelle ne nous a pas permis d'établir un quelconque lien de cause à effet entre caractéristiques phénotypiques des souches impactées (*i.e.* propriétés de l'interphase, résistance au stress osmotique/oxydatif) et sensibilité/résistance aux NP-TiO<sub>2</sub>. Cependant, ces résultats obtenus dans des conditions relativement proches de la réalité environnementale apportent des éléments nouveaux d'appréciation des risques associés aux rejets de NP dans les écosystèmes aquatiques.



**Figure 10.** Assemblages trophiques réalisés dans le cadre du programme Mesonnet aux laboratoires **A.** LIEC (Metz) et **B.** Ecolab (Toulouse). Au LIEC le réseau trophique est constitué d'algues (*P. subcapitata*, *C. vulgaris*, *S. subspicatus*) → dreissène (*D. polymorpha*) → consortium bactérien nitrifiant et à ECOLAB d'un biofilm bactérien/diatomées (*N. palea* et *N. pelliculosa*) → chironomes (*C. riparius*) → amphibien (*P. waltl*) → consortium bactérien nitrifiant. **C.** Systèmes expérimentaux utilisés sur les deux sites dans le cadre du programme Mesonnet. EPS : exopolysaccharides ; MOD/MOP : matière organique dissoute et particulaire.

\* Jomini S., Clivot H., Bauda P., Pagnout C., 2015. Impact of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. *Environmental Pollution*, 202: 196-204. IF<sub>2019</sub> 6.79 - N citations : 30.

Toujours dans un soucis d'évaluation pertinente du risque environnemental associé au rejet des NP dans l'environnement, le LIEC a été activement impliqué dans l'ANR P2N *Mesonnet* (*Mesocosm network for Environmental Nanotechnology Risk Assessment*) dont le but était d'évaluer le comportement et les effets de divers nanomatériaux manufacturés dans des systèmes expérimentaux multi-espèces de type mésocosmes (9 mésocosmes de 50 L). Des organismes modèles associés en chaînes trophiques simplifiées ont ainsi été exposés plusieurs semaines à différents types de nanomatériaux (NP-CeO enrobé et non-enrobé – NP-Ag sphérique ou plaque – NP-TiO<sub>2</sub> anatase ou rutile sous formes cubique ou bâtonnet). Ces expérimentations ont été réalisées parallèlement sur Metz (Lab. LIEC) et sur Toulouse (Lab. Ecolab) (**Figure 10**). Ma participation à ces activités de recherche comprenait l'ensemencement des mésocosmes messins et toulousains avec un consortium bactérien nitrifiant permettant d'éviter l'accumulation dans le milieu des ions ammoniums et nitrites néfastes aux organismes aquatiques, le suivi de l'évolution de ce consortium dans les mésocosmes avant exposition aux NP (phase de stabilisation du système), et l'évaluation de l'impact des NP sur la structure/diversité (PCR-DGGE) des communautés bactériennes pélagiques et benthiques.



**Figure 11.** Effets des NP-CeO<sub>2</sub> (enrobage citrate et non-enrobé) sur **A.** l'abondance en bactéries dans la colonne d'eau au cours du temps et sur la structure des communautés bactériennes **B.** pélagiques et **C.** benthiques au 7<sup>ème</sup> jour (T2), 14<sup>ème</sup> jour (T4) et au 28<sup>ème</sup> jour (T5) dans les mésocosmes. Sur la Fig. 11 A, la flèche rouge indique la date d'introduction des bivalves dans le réseau. Les flèches bleues indiquent les dates d'ajout des NP-CeO<sub>2</sub> (12 ajouts de 84 µg/L, soit 1 mg/L en concentration finale). Sur la Fig. 11C, l'ellipse indique des résultats significativement différents.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques (Bour *et al.*, 2016a\* ; Bour *et al.*, 2016b\*\* ; Garaud *et al.*, 2016\*\*\*) montrant de façon convergente (i) l'agrégation de ces nanomatériaux dans la colonne d'eau et leur rapide sédimentation, (ii) leurs effets délétères sur les organismes aquatiques ainsi que leur fort potentiel de bioaccumulation, (iii) des effets sur l'abondance et la structure des communautés microbiennes. Ces effets pouvant être de nature directe *via* la toxicité des NP et/ou des ions métalliques libérés dans le milieu ou indirecte *via* des effets sur les activités/fonctions des autres organismes du réseau. A titre d'exemple, la **Figure 11** illustre les résultats obtenus sur les bactéries lors de l'exposition des mésocosmes messins aux NP-CeO<sub>2</sub>. Deux types de nanomatériaux ont été utilisés dans le cadre de cette étude, une dispersion de NP-CeO<sub>2</sub> enrobées de triammonium citrate (Nanobyk®3810 commercialisé par la compagnie Byk) et une dispersion équivalente de NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées (Rhodia). Ces nanomatériaux sont communément introduits dans les peintures et laques pour leurs propriétés anti-UV. L'enrobage de citrate a pour objectif de faciliter la dispersion de la suspension de NP-CeO<sub>2</sub> dans l'eau et les peintures aqueuses. La **Fig. 11 A** révèle au 12<sup>ème</sup> jour d'exposition, un effet significatif sur l'abondance en bactéries dans la colonne d'eau des NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées par rapport aux enrobées et au témoin non-exposé. La **Fig. 11 C** met en évidence un impact des NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées et, de façon moindre, des enrobées sur la structure des communautés bactériennes benthiques au 14<sup>ème</sup> jour (T4). Ces différents effets observés entre les NP-CeO<sub>2</sub> enrobées et non-enrobées peuvent potentiellement s'expliquer par la physicochimie de ces NP et leurs comportements singuliers dans le milieu d'exposition. En effet, en raison de leurs charges de surface majoritairement négatives dues à l'enrobage citrate, les NP-CeO<sub>2</sub> enrobées présentent un degré de stabilité dans la colonne d'eau supérieur au NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées (Tella *et al.*, 2014). Les interactions électrostatiques entre NP-CeO<sub>2</sub> enrobées et autres colloïdes du milieu (*i.e.* microorganismes, argiles, exopolysaccharides) sont de nature majoritairement répulsives, ce qui limite leur hétéro-agrégation et leur sédimentation (Auffan *et al.*, 2014 ; Tella *et al.*, 2014). A l'opposé, dans les conditions du milieu, les NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées ont une charge de surface globalement neutre conduisant à leur agrégation/précipitation et leur rapide accumulation dans les

---

\* Bour A., Mouchet F., Cadarsi S., Silvestre J., Chauvet E., Bonzom J.-M., Pagnout C., Clivot H., Gauthier L., Pinelli E., 2016a. Impact of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: a microcosm study. *Environmental Science-Nano* 3 (4), 830-838. IF<sub>2019</sub> 7.59 - N citations : 27

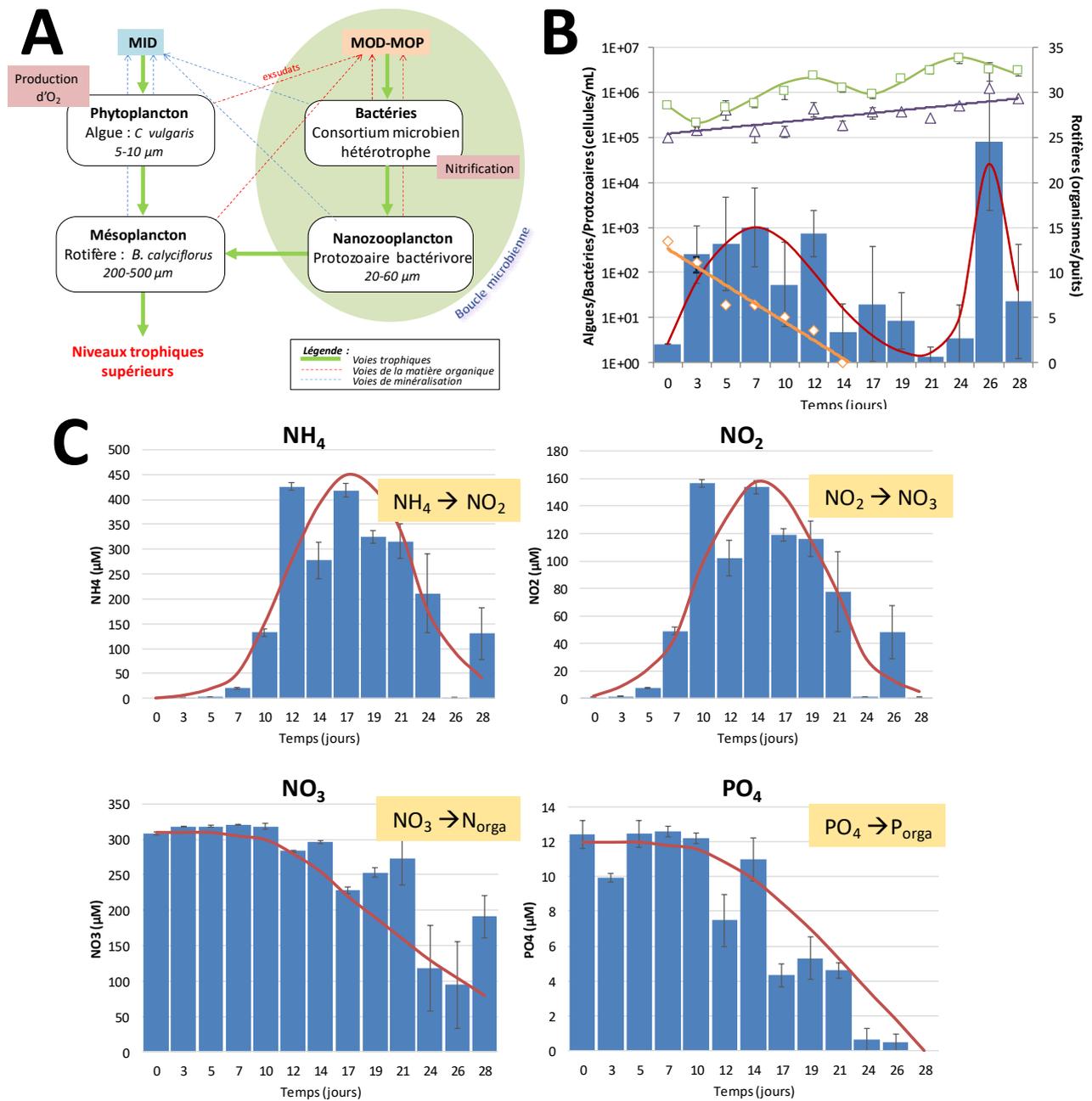
\*\* Bour A., Mouchet F., Cadarsi S., Silvestre J., Verneuil L., Baque D., Chauvet E., Bonzom J.-M., Pagnout C., Clivot H., Fourquaux I., Tella M., Auffan M., Gauthier L., Pinelli E., 2016b. Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology* 10 (2), 245-255. IF<sub>2019</sub> 6.3 - N citations : 35

\*\*\* Garaud M., Auffan M., Devin S., Felten V., Pagnout C., Pain-Devin S., Proux O., Rodius F., Sohm B., Giambérini L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10 (7), 935-944. IF<sub>2019</sub> 6.3 - N citations : 27

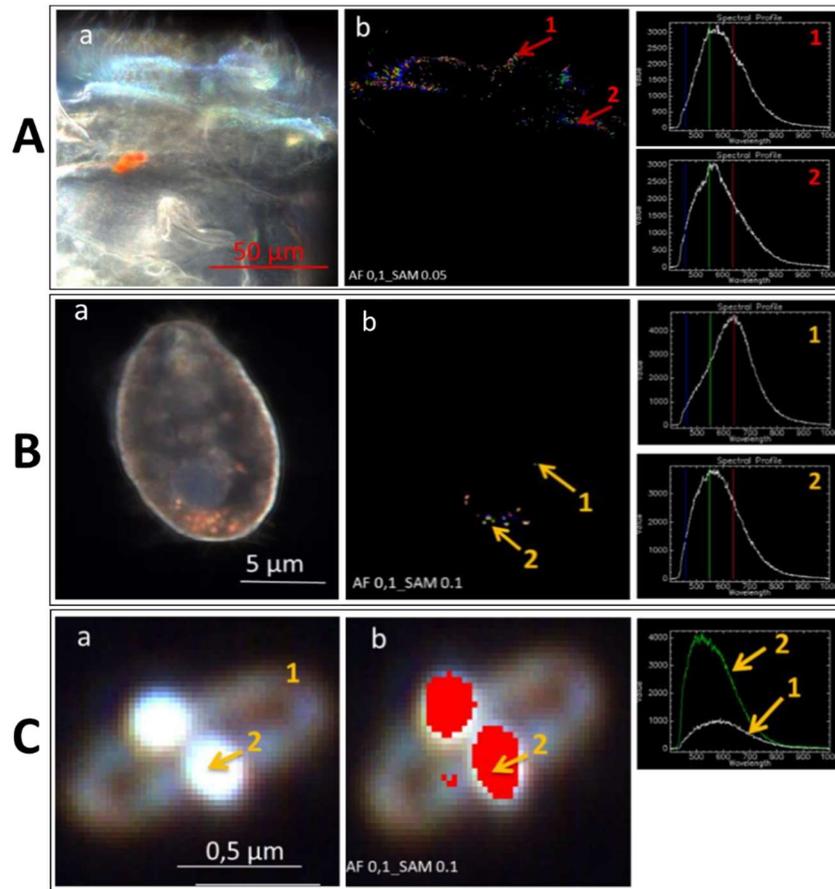
premières couches de sédiment (Tella *et al.*, 2014). A noter également qu'en relation étroite avec leur activité de filtration de la colonne d'eau, les bivalves exposés aux NP-CeO<sub>2</sub> enrobées présentent des concentrations en Cérium dans leurs glandes digestives trois fois supérieures à celles des bivalves exposés aux NP-CeO<sub>2</sub> non-enrobées (Garaud *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus dans le cadre de l'ANR *Mesonnet* ont très clairement mis en évidence un risque environnemental lié au rejet de nanomatériaux dans l'environnement. Les mésocosmes constituent une alternative intéressante aux essais monospécifiques en proposant un niveau de représentativité supérieur. Cependant, de par leur dimensionnement important et leur complexité de mise en œuvre, ils ne permettent qu'un nombre limité de répliques et de variables à tester, ce qui rend difficile l'extrapolation des données à l'échelle d'un écosystème. Cela est d'autant plus vrai pour les NP qui présentent des propriétés physicochimiques singulières pouvant induire des effets dose-réponse non linéaires. Le manque de répliques rend également complexe l'évaluation des effets sur le compartiment microbien en raison notamment d'une trop forte hétérogénéité observée dans les systèmes mésocosme étudiés.

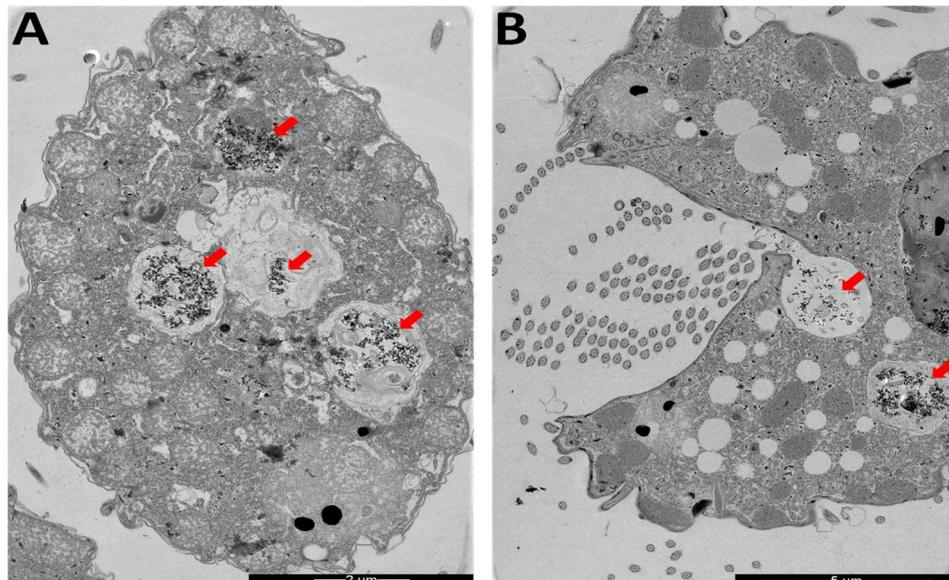
Ces différentes raisons nous ont donc amené à développer dans le cadre de la thèse de Anne Vicente (2015-2019) un système d'évaluation du risque novateur de faible dimensionnement (4 mL en microplaques 12 puits) combinant une chaîne trophique microbienne simple composée d'un producteur primaire (algues : *Chlorella vulgaris*) et d'un consommateur primaire (rotifères : *Brachionus Calyciflorus*) à une boucle microbienne associant un consortium bactérien nitrifiant à un protozoaire bactériophage (*Chilomonas paramecium* ou *Tetrahymena pyriformis*) (**Fig. 12 A**). Ce protozoaire assurant ainsi le lien entre les bactéries et les métazoaires. Au sein de ce réseau trophique modèle, les algues se développent sous exposition lumineuse et produisent de l'oxygène en utilisant la matière inorganique dissoute (MID) présente dans le milieu (eau de synthèse développée spécifiquement pour le réseau). Ces algues servent alors de ressource trophique aux rotifères. La matière organique dissoute et particulaire (MOD/MOP) rejetée dans le milieu par les algues (exsudats) et les rotifères (détritons, fèces) est consommée par le consortium bactérien hétérotrophe. Les bactéries nitrifiantes présentes dans le consortium transforment alors les ions toxiques ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), éléments nutritifs essentiels au développement algal. Le protozoaire bactériophage joue également un rôle important dans le réseau. Il contribue à la croissance algale en excréant une partie des nutriments assimilés (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Il limite la prolifération bactérienne et donc la compétition avec les producteurs primaires vis-à-vis des nutriments. Ce protozoaire flagellé sert également de ressource trophique aux rotifères (principe de la boucle microbienne).



**Figure 12. A.** Représentation schématique du réseau trophique microbien développé et des interactions entre les différents (micro)organismes. MID : Matière inorganique dissoute ; MOD/P : Matière organique dissoute/particulaire. **B.** Evolution de la concentration en (micro)organismes dans le réseau trophique. Histogramme : nombre de rotifères par puits (4 mL) ; carrés verts : concentration en algues ; triangles violets : concentration en bactéries ; losanges oranges : concentration en protozoaires. **C.** Evolution de la concentration en ions NH<sub>4</sub> (processus d'ammonification), NO<sub>2</sub> (nitritation), NO<sub>3</sub> (nitratation) et PO<sub>4</sub> dans le réseau trophique



**Figure 13.** Photos en microscopie hyperspectrale (Cytoviva) montrant l'adsorption/accumulation de nanoparticules d'Ag (A et B) et de  $\text{TiO}_2$  (C) sur/dans les rotifères *B. calyciflorus* (A), le protozoaire *T. pyriformis* (B) et la bactéries *E. coli* (C) après 20h d'exposition à 1 mg/L.



**Figure 14.** Photos en microscopie électronique (MET) de protozoaires (*T. pyriformis*) exposés à des NP- $\text{TiO}_2$  (5 h à 10 mg/L de P25). Les flèches indiquent les vésicules digestives contenant des NP- $\text{TiO}_2$ . A. Image montrant un protozoaire dans son intégralité ; B. image montrant le cytostome (bouche) et la formation d'une vésicule digestive, ainsi que les cils (coupe transversale) permettant l'ingestion des particules en suspension.

Le développement des différents organismes dans le système peut être suivi sur une période pouvant aller jusqu'à 28 jours sans qu'aucun renouvellement de milieu ne soit effectué. Le bioessai développé permet ainsi d'évaluer les effets d'un ou plusieurs contaminants sur les différents maillons trophiques et sur leurs interactions. Les paramètres pouvant être mesurés à différents temps comprennent (i) La densité en algues, protozoaires, bactéries, et rotifères, permettant d'appréhender les dynamiques de populations (**Fig. 12 B**). Ce paramètre est intégrateur de la survie, croissance/reproduction et des relations proies-prédateurs ; (ii) La mesure de paramètres physico-chimiques clés du milieu, comme le pH, la température, l'oxygène dissous, la teneur en  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{Cl}^-$  (**Fig. 12 C**) ; (iii) La diversité bactérienne ainsi que la structure des communautés par approches moléculaires.

Le réseau microbien ainsi développé a été soumis à différents stress (métaux : Cd, Cu, Zn ; terres rares : Ce, Gd, Lu) et les résultats obtenus sur les dynamiques de population des rotifères ont été comparés à ceux obtenus avec le bioessai normalisé Rotoxkit 48 heures. De façon général le réseau présente un niveau de sensibilité aux contaminants testés légèrement inférieur au Rotoxkit, probablement en raison du stade de développement des organismes exposés (*i.e.* adultes vs. néonates) et/ou de la complexité du milieu d'exposition (apport de P et N pouvant impacter la spéciation des contaminants). Le système réseau est cependant beaucoup plus intégrateur, car prenant en compte plusieurs niveaux trophiques. Il fait également preuve d'une résilience supérieure comparé aux essais monospécifiques normalisés.

Le réseau développé permet également le suivi de paramètres de toxicité pertinents comme la bioaccumulation/biomagnification de certains contaminants. La biomasse dans ces systèmes expérimentaux n'étant pas suffisante pour envisager des approches physicochimiques classiques de dosage de contaminants (*e.g.* ICP-MS), des approches en microscopie électronique et microscopie hyperspectrale ont été testées et validées dans le cadre du stage de M2 de Yoann Menard (2018-2019). L'avantage de la microscopie hyperspectrale est qu'elle ne nécessite pas de préparation spécifique des échantillons avant analyse (*i.e.* fixation, déshydratation, inclusion en résine, coupes). Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude (**Figure 13**) ont notamment permis de mettre en évidence l'adsorption et/ou la bioaccumulation de nanomatériaux (*i.e.*  $\text{TiO}_2$  et Ag) sur/dans les différents microorganismes du réseau (bactéries, protozoaires, rotifères). Des approches parallèles réalisées en microscopie électronique à transmission (MET) ont mis en évidence la phagocytose des NP par les protozoaires et leur accumulation dans les vésicules digestives (**Figure 14**).

Les futurs travaux de recherche sur le réseau trophique microbien auront pour objectifs d'améliorer la pertinence écologique du système (*Relevance*), sa fiabilité (*Reliability*), répétabilité (*Repeatability*), reproductibilité (*Reproducibility*), et sa robustesse (*Robustness*) comme précédemment décrit par Calow en 1993 pour définir les critères de qualité d'un bon test en

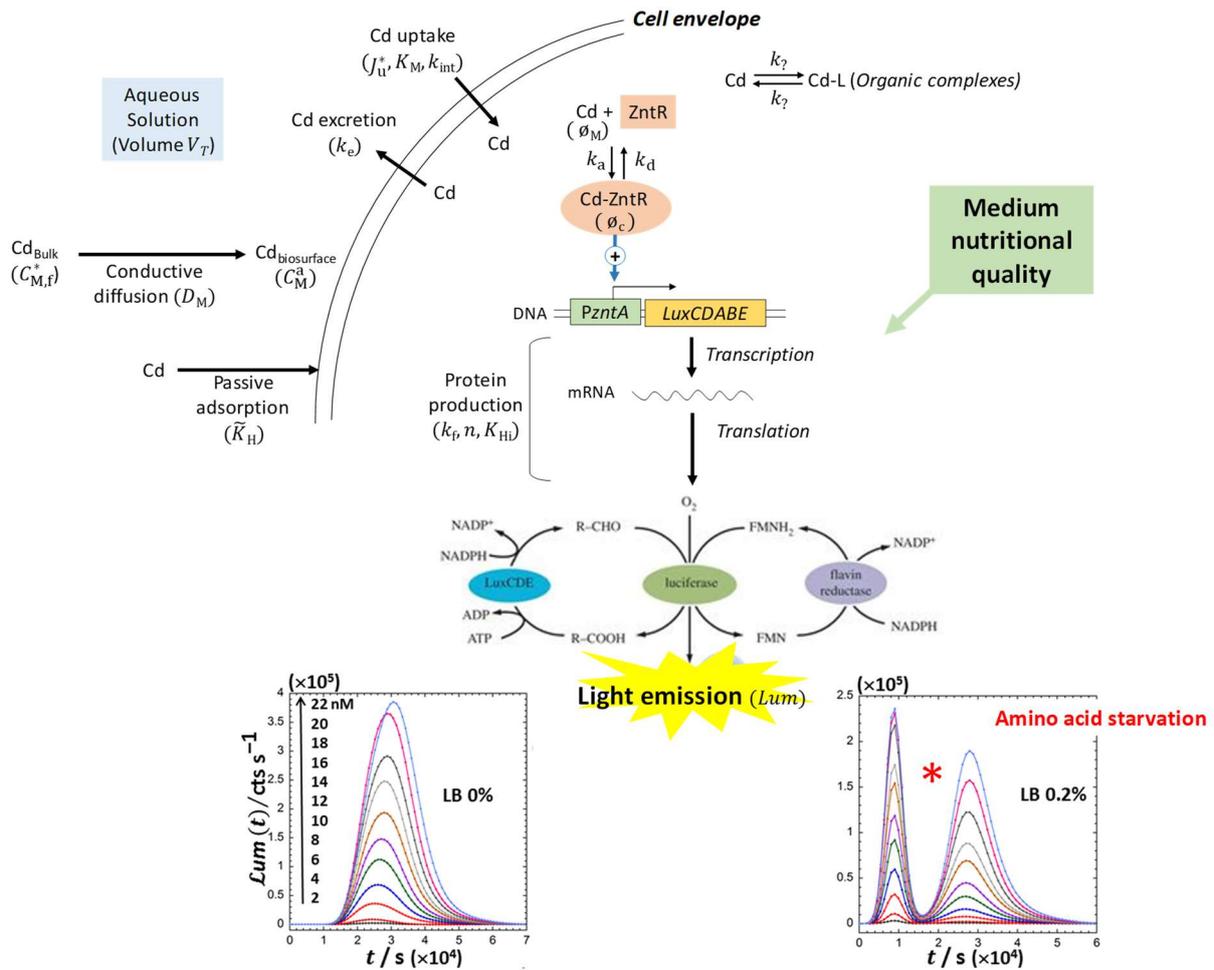
écotoxicologie (règle des 5R) (Calow, 1993). Le système développé sera également utilisé par des collègues du laboratoire dans le cadre d'études de forçages anthropiques (individuels ou conjugués) associés à des approches de modélisation. Le système ainsi conçu permet en effet l'analyse conjointe d'un grand nombre de variables et de répliques (12 bioessais par microplaque – soit 924 bioessais/m<sup>2</sup>) sans réelle contrainte de place.

### **2.3.5. La luminescence bactérienne comme système rapporteur de l'expression des gènes**

Mes précédents travaux se sont intéressés à la description, l'analyse et la compréhension des mécanismes régissant la toxicité des nanoparticules (NP) sur les bactéries. Pour ce faire, différentes approches expérimentales ont été adoptées (*i.e.* biochimiques, moléculaires, électrocinétiques, nanomécaniques) à différents niveaux d'organisation biologique (local, cellulaire, population, communauté). Les résultats obtenus ont contribué à élucider bon nombre de questionnements mais souffrent cependant des limites liées à la lourdeur et/ou au coût des expérimentations limitant ainsi le nombre de conditions/variables testées et nous obligeant à faire des choix stratégiques parfois difficilement justifiables. C'est le cas notamment des durées d'exposition, des concentrations en contaminant testées, des milieux d'exposition, ainsi que du nombre de répliques par condition. Ceci est d'autant plus vrai lorsque l'on s'intéresse aux pouvoirs bactéricides des NP qui, comme nous l'avons précédemment démontré, sont la résultante de plusieurs mécanismes et cinétiques complexes (agrégation/agglomération des NP, interactions NP-cellules, solubilisation des NP et libération d'ions toxiques, altération de l'interphase bactérienne) influencés par la concentration en NP, la concentration en cellules, la physicochimie du milieu d'exposition (*e.g.* composition, force ionique, pH).

C'est donc dans ce contexte qu'a émergé l'idée d'utiliser des systèmes rapporteurs bioluminescents à cellules entières (système rapporteur *LuxCDABE*) pour évaluer l'expression de gènes cibles impliqués dans différents mécanismes de défense et/ou de régulation globaux afin d'évaluer l'activité/viabilité du microorganisme exposé aux NP. Ces biosenseurs ont de nombreux avantages, notamment de permettre l'acquisition d'un signal semi-continu sur plusieurs heures/jours sans dénaturation de l'échantillon. Ils permettent également l'analyse simultanée d'un nombre important de variables (essais en microplaque 96 puits) et ne nécessitent pas d'ajout de composés exogènes et/ou l'utilisation d'une source externe de lumière excitatrice. De plus, contrairement aux systèmes rapporteurs fluorescents (*e.g.* système encodant une protéine GFP), les biosenseurs luminescents ont l'avantage d'être plus sensibles dû à l'absence de bruit de fond (autofluorescence de certaines

protéines) et plus dynamiques en raison notamment d'un temps de demi-vie court de la luciférase (10-30 min) et du complexe luciférase-FMNH2 (<1 min). Malgré leur développement il y a maintenant une trentaine d'années, les biosenseurs luminescents souffrent encore à ce jour d'un certain nombre de lacunes dans la compréhension du mécanisme à l'origine de la bioluminescence mais également dans l'interprétation du signal obtenu.



**Figure 15.** Représentation schématique des mécanismes d'induction de la luminescence dans le cas du biosenseur *E. coli* contenant la fusion du promoteur *pZntA* inductible par la  $Cd(II)$  aux gènes *luxCDABE*. Le signal luminescent émis est déterminé dans le temps par les processus de transfert (diffusion conductive) du  $Cd(II)$  vers les cellules, par les processus de sorptions active et passive, par les mécanismes d'activation du promoteur *pZntA* contrôlant la transcription des gènes *LuxCDABE*, et par la concentration et l'activité enzymatique de la luciférase. L'amplitude du signal et sa fréquence (signal monomodal ou bimodal) dans le temps sont également étroitement liées à la composition nutritionnelle du milieu (e.g. la composition en acides aminés).

Dans l'objectif de combler une partie de ces manques, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la réponse temporelle d'un biosenseur bactérien luminescent modèle répondant au cadmium (*E. coli* – *pZntA-LuxCDABE*) (Reither *et al.*, 2001). L'utilisation de biosenseurs bactériens pour

l'évaluation de la concentration en contaminants métalliques dans les milieux aquatiques demeure toujours à l'état de preuve de concept en sciences de l'environnement. Ceci s'explique notamment par le caractère multifactoriel et la complexité des différents processus biologiques et physico-chimiques intra- et extra-cellulaires qui déterminent *in fine* la dépendance temporelle du signal émis (**Figure 15**).

L'expérimentation, confrontée à des modélisations théoriques, nous a permis de démontrer que l'émission de photons est déterminée dans le temps (*i*) par la fraction de métal internalisée et plus particulièrement les processus qui déterminent la partition des métaux à l'interphase bactérienne. Ces processus incluent les processus de transfert du Cd(II) vers les cellules (diffusion conductive), de sorption passive et active du métal et sa possible excrétion via les pompes d'efflux membranaires ; (*ii*) par les mécanismes d'activation du promoteur *pZntA* contrôlant la transcription des gènes *LuxCDABE* et donc, plus en amont, par la formation du complexe ion métallique-protéine répresseur (Cd-ZntR) ; et (*iii*) par la quantité de luciférase (LuxAB) produite et son activité enzymatique (flux de photons émis). Activité enzymatique elle-même dépendante de la production et activité de LuxCDE. Ainsi, nos précédents travaux (Pagnout *et al.*, 2018\* ; Duval *et al.*, 2019\*\* ; Duval *et al.*, 2020 \*\*\*) ont permis d'établir un cadre théorique reproduisant la réponse du biosenseur *E. coli* - *pZntA-LuxCDABE* en fonction de la concentration en cellule, de la salinité du milieu et de sa composition nutritive (concentration en acides aminés et en carbohydrates) dans un régime de réponse linéaire à la concentration en Cd(II). En jouant sur la composition nutritive du milieu, nous avons démontré la possibilité de moduler la réponse du biosenseur dans le temps (0-48 h) en contrôlant la fréquence du signal (multimodalité du signal) et son amplitude.

L'utilisation de biosenseurs bactériens luminescents et le décryptage temporel du signal émis s'avèrent être de puissants outils pour l'étude de la spéciation/biodisponibilité d'éléments métalliques dans des matrices complexes mais également, dans la continuité de ce qui a été présenté sur les effets bactéricides des nanoparticules, dans une compréhension plus mécanistique de leurs modes d'action. Ces aspects seront développés plus en détail dans le **chapitre 3.2.2** du *Projet Scientifique*.

---

\* Pagnout C., Présent R.-M., Billard P., Rotureau E., Duval J.-F.-L., 2018. What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory *Sensors and Actuators B-Chemical* 270, 482-491. IF<sub>2019</sub> 7.1 - N citations : 4

\*\* Duval J. F., Pagnout C., 2019. Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sensors* 4, 1373–1383. IF<sub>2019</sub> 7.33 - N citations : 2

\*\*\* Duval J., Pagnout C., 2020. Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters: experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B-Chemical* 309, 127751. IF<sub>2019</sub> 7.1 - N citations : 1

## 3. Projet scientifique

### 3.1. Cadre conceptuel

Mon projet scientifique s'inscrit dans la continuité des travaux précédemment réalisés et sera majoritairement centré sur la compréhension des mécanismes d'action bactéricides d'agents nanoparticulaires. En adéquation avec les problématiques du moment, ces nanomatériaux pourront être de natures différentes (*i.e.* nanoparticules métalliques et/ou d'oxydes métalliques, nanoplastiques, polymères, biovésicules).

Depuis maintenant 10 ans, mon activité de recherche est focalisée sur les effets délétères des nanoparticules d'oxydes métalliques, et plus spécifiquement du TiO<sub>2</sub>, sur les microorganismes et, en étroite collaboration avec mes collègues biologistes et physicochimistes, nous avons formulé un certain nombre de questionnements et validé plusieurs de nos hypothèses. Le sujet est vaste et un certain nombre de points demandent encore à être clarifiés. Le premier étant le **rôle joué par le stress oxydatif dans le mécanisme de toxicité des NP**. Sur cet aspect, nos propres travaux présentent un certain nombre de contradictions. Pour rappel, dans Sohm *et al.* (2015), l'analyse globale du transcriptome et protéome d'*E. coli* après exposition aux NP-TiO<sub>2</sub> (20 h à 100 mg/L) a révélé un **stress osmotique comme mécanisme primaire de toxicité**. Les gènes et protéines impliqués dans le stress oxydatif n'ayant pas présenté de dérégulation significative. Dans Jomini *et al.* (2014), la modification du test d'Ames nous a permis de mettre en évidence le caractère génotoxique des NP-TiO<sub>2</sub>. La sensibilité de la souche *S. typhimurium* TA102, historiquement développée par Levin *et al.* (1982) pour détecter les effets mutagènes induits par la génération de ROS, nous a amené à considérer le stress oxydatif comme mécanisme possible de (géo)toxicité. Dans Pagnout *et al.* (**Annexe 1**), la multiplicité des approches expérimentales utilisées pour analyser la réponse de la souche *E. coli* JW3606 (mutant *rfa* deep-rough sensible aux NP-TiO<sub>2</sub>) exposée à une gamme croissante de NP-TiO<sub>2</sub> (20 h à 1-50 mg/L) a permis de confirmer de façon indéniable l'action mécanique des NP sur les bactéries suite à leur adsorption. L'adsorption des NP sur la surface bactérienne altère physiquement l'enveloppe membranaire (*i.e.* abrasion, perforation, désintégration) et induit un mécanisme de réponse cellulaire équivalent à celui d'un **stress osmotique conduisant *in fine* à une perte de viabilité**. Cette même étude a également mis en évidence le marquage des cellules au Bodipy (*lipid peroxydation sensor*) et au H<sub>2</sub>DCFDA (*oxidative stress sensor*) aux plus fortes concentrations en NP, et la dérégulation de gènes impliqués dans le mécanisme de réponse au stress oxydatif (**Annexe 1**). Cette dérégulation reste cependant modérée sur toute la gamme de concentrations en NP-TiO<sub>2</sub> testée.

Ces différents résultats nous amènent donc à formuler deux hypothèses concernant le(s) mécanisme(s) d'action bactéricide(s) des NP-TiO<sub>2</sub> :

> **Hypothèse 1.** Les NP s'adsorbent sur la surface bactérienne et induisent du stress oxydatif *via* la production de ROS et/ou la perturbation de l'état redox cellulaire. La cellule va être en mesure de contrer ces effets jusqu'à une concentration critique au-delà de laquelle la membrane sera déstabilisée au point qu'elle ne sera plus en mesure d'assurer son rôle de barrière semi-perméable (stress osmotique). Des dommages trop conséquents et irréversibles conduiront à la mort de la cellule.

Il n'y a actuellement pas de consensus clair concernant la génération de ROS à la surface des NP-TiO<sub>2</sub> en milieu aqueux et à l'obscurité (Li *et al.*, 2014). Les ROS sont des radicaux à temps de vie très court (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-11</sup> s pour OH<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), ce qui rend leur détection difficile dans les matrices aqueuses et les systèmes biologiques. La Résonance de Spin Electronique (ESR : *Electron Spin Resonance*) est actuellement reconnue comme étant la méthode *in situ* la moins sujette à caution pour la détection des radicaux libres et elle est communément employée dans les nanosciences. Concernant les NP-TiO<sub>2</sub> non-illuminés, les résultats obtenus en ESR sont relativement contradictoires. Certains auteurs ayant démontré l'absence de production de ROS (Yin *et al.*, 2012) et d'autres la production de radicaux hydroxyle OH<sup>•</sup> (Fenoglio *et al.*, 2009 ; Lipovsky *et al.*, 2012 ; Leung *et al.*, 2016) et d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Lipovsky *et al.*, 2012). Dans leurs récents travaux, Leung *et al.* (2016) ont mis en évidence par ESR la production de OH<sup>•</sup> par les NP-TiO<sub>2</sub> et NP-ZnO à l'obscurité (OH<sup>•</sup> NP-ZnO >> OH<sup>•</sup> NP-TiO<sub>2</sub>) et l'induction des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS uniquement dans le cas de l'exposition aux NP-ZnO. La toxicité des NP-TiO<sub>2</sub> étant supérieure à celle des NP-ZnO, et ce malgré la libération d'ions Zn dans le milieu, les auteurs concluent à l'existence d'un mécanisme d'action bactéricide alternatif à celui lié à la production de ROS (*quid du stress osmotique ?*). Ces mêmes travaux ont également mis en évidence une baisse significative de la production des *Outer Membrane Proteins* (OMP) dans les cellules exposées aux NP-TiO<sub>2</sub>. Les auteurs suggèrent que ces protéines pourraient être des éléments cibles des NP-TiO<sub>2</sub> ; mais ne font malheureusement aucun parallèle avec un possible stress osmotique induit par les NP. La relation entre régulation des OMP et stress osmotique étant très largement décrite dans la littérature (Barron *et al.*, 1986 ; Suzuki *et al.*, 1996 ; Hommais *et al.*, 2001 ; Dupont *et al.*, 2007 ; Seo *et al.*, 2017).

La formation de ROS peut également se produire à l'interface nano-bio *via* les interactions physiques entre les NP et les structures cellulaires impliquées dans les réactions redox (Unfried *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Kaweeteerawat *et al.*, 2014). Comme le démontre les modèles prédictifs, en fonction de la proximité relative entre le potentiel d'oxydo-réduction standard des couples redox en milieu aqueux et le haut de la bande de valence ou le bas de la bande de conduction, des échanges

d'électrons peuvent se produire (Burello and Worth, 2011). Les potentiels redox standards biologiques se situant entre -4,12 et -4,84 eV et la bande de conduction des NP-TiO<sub>2</sub> non irradié autour de -4,3 eV (Burello and Worth, 2011), ces NP seraient en mesure de perturber l'état redox cellulaire, d'altérer le métabolisme énergétique et donc de générer du stress oxydant conduisant à des dégâts cellulaires plus ou moins réversibles (peroxydation lipidique, oxydation des protéines).

> **Hypothèse 2.** Les NP s'adsorbent sur la surface bactérienne et vont mécaniquement endommager la membrane bactérienne. Le schéma sera ensuite similaire au précédent sauf que dans ce cas le stress oxydatif ne serait pas à l'origine du stress osmotique mais sa résultante.

Plusieurs études ont mis en évidence une réponse moléculaire commune entre les stress osmotique et oxydatif chez les bactéries (Mager *et al.*, 2000, Gunasekera *et al.* 2008 ; Bojanovič *et al.*, 2017), avec notamment l'induction de gènes codant des enzymes impliquées dans l'élimination des ROS (Superoxyde dismutases, catalases, peroxydases). Il a également été démontré la sensibilité accrue des mutants *E. coli sodA* et *sodB* au stress osmotique et l'induction par le stress osmotique des gènes *soxS* et *sodA*. Les auteurs suggèrent qu'un changement osmotique du milieu induisant une perturbation des fonctions membranaires entrainerait la production de ROS *via* la chaîne respiratoire (Smirnova *et al.*, 2000). Les constituant membranaires de la chaîne respiratoire étant source de ROS en condition de croissance aérobie chez *E. coli* (Imlay and Fridovich, 1991 ; González-Flecha and Demple, 1995).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action bactéricides des NP et valider ou non les précédentes hypothèses, il me semble judicieux d'aller vers l'**acquisition de données temporelles et spatiales à concentrations en NP variables**. Nous avons précédemment démontré sur la souche *E. coli* JW3606 sensible aux NP-TiO<sub>2</sub> l'importance d'une évaluation des effets des contaminants à différentes concentrations. Ces travaux ayant révélé des régimes de réponses distincts en fonction de la concentration en NP et du degré d'altération de l'enveloppe cellulaire. Les données temporelles et spatiales permettraient quant à elles d'appréhender **la cinétique et la dynamique des réponses toxicologiques** de la cellule aux NP (*e.g.* stress osmotique 1 et stress oxydatif 2, ou inversement – lien de cause à effet entre les deux mécanismes) et de **(co-)localiser ces effets** à l'échelle de la cellule. Ce qui devrait notamment permettre d'identifier les constituants cellulaires primo-impactés par les NP ainsi que les zones d'émission des ROS. Ces expérimentations devraient également permettre de mieux comprendre le rôle joué par les OMV dans le mécanisme de réponse et de résistance des bactéries aux NP : la vésiculation facilite t'elle la désorption des NP adsorbées sur la surface bactérienne ? quelles sont les cinétiques d'interactions NP-OMV dans le milieu ? Les NP peuvent-elles être internalisées dans les OMV ? et si c'est le cas, quels seront les

propriétés/caractéristiques (e.g. propriétés physico-chimiques, comportement dans le milieu, toxicité) de ces nouvelles *core-shell* structures ?

Nos précédents travaux se sont également intéressés aux effets des NP sur la structure/diversité des communautés bactériennes avec des scénarios d'exposition se voulant toujours plus proches de la réalité environnementale de par notamment le choix des NP utilisées, leurs concentrations dans le milieu, et/ou les (micro)organismes ciblés. Les résultats obtenus restent cependant insuffisants et difficiles à extrapoler dans le cadre de l'évaluation du risque. A des doses environnementales, les NP manufacturées ne semblent pas présenter un niveau de toxicité/réactivité suffisant pour induire sur les microorganismes des effets délétères susceptibles de perturber le fonctionnement des écosystèmes... du moins pas directement ! Les microorganismes peuvent cependant faciliter l'entrée de ces contaminants dans les réseaux trophiques et augmenter les flux vers les niveaux trophiques supérieurs *via e.g.* l'adsorption sur les surfaces membranaires, la diffusion/bioaccumulation dans les biofilms, l'internalisation par les protozoaires. Ces différents aspects méritent donc d'être d'avantage étudiés mais se heurtent au manque d'outils pertinents pour quantifier ces effets.

Par le biais d'approches expérimentales originales et complémentaires réalisées à différentes échelles d'observation (*i.e.* moléculaire, cellule, population, communauté), nos travaux ont permis des avancées significatives dans l'évaluation et la compréhension des effets délétères des NP sur les bactéries. Cependant, si je dois être critique sur mon propre travail et identifier des manques, je dirais que le **lien entre ces différentes échelles d'observation** mériterait d'être d'avantage étudié (*quid du changement d'échelle ?*). A l'échelle d'une seule et même population bactérienne, quelle relation existe-t-il entre l'hétérogénéité de la réponse observée (*i.e.* adsorption des NP, dommages membranaires, perte de viabilité) et l'état physiologique et/ou stade de développement (*i.e.* cellules en division, néoformées, matures) du microorganisme (*lien cellule-population*) ? A cet égard, les résultats obtenus en AFM sont très pertinents et les mesures de module d'Young, de  $K_{cell}$  et d'indentation effectuées de manière aléatoire sur des cellules ( $N = 8$ ) exposées aux NP-TiO<sub>2</sub> sont révélatrices de réponses individuelles contrastées (**Annexe 1 – Fig. 8**). Ces différentes réponses étant elles-mêmes déterminées par des propriétés physiologiques intrinsèques qui restent encore à ce stade non déterminées. Des approches en microscopie confocale pourraient s'avérer pertinentes dans ce sens et seront discutées plus en détail dans le chapitre suivant. Pour ce qui est du *lien population-communauté*, celui-ci me paraît plus difficile à appréhender. Cependant, une stratégie consistant à **identifier les proxys** (ou traits biologiques en écologie des communautés) **déterminant le phénotype de sensibilité/résistance aux NP** sur différentes espèces bactériennes isolées de consortiums naturels

pourrait s'avérer intéressante. La structure/composition de l'enveloppe cellulaire s'est avérée être un paramètre déterminant de toxicité, que ce soit le type de Gram (Slavin *et al.*, 2017) ou plus spécifiquement, comme nous l'avons démontré sur des mutants d'*E. coli* présentant des LPS de compositions variables, la nature de l'interphase bactérienne. Sur la base de nos précédents travaux, on peut également se demander ce qu'il en est des proxys résistance/sensibilité au stress osmotique et oxydatif ou de la capacité à vésiculer pour différentes espèces bactériennes considérées. En relation avec le stress oxydatif, quand est-il de la sensibilité/résistance des bactéries anaérobies aux NP sachant qu'elles sont le plus souvent dépourvues de la machinerie enzymatique permettant l'élimination des ROS ? Ces différents aspects peuvent s'avérer extrêmement pertinents pour le développement de modèles prédictifs de toxicité, que ce soit dans le cadre de la préservation/protection des bactéries d'intérêt (*i.e.* bactéries présentant un rôle écosystémique majeur, flore commensale) ou l'élimination des bactéries pathogènes (*i.e.* traitement de l'eau, lutte contre les BMR) (se référer au **chapitre 2.2. Contexte**).

## 3.2. Cadre opérationnel

### 3.2.1. La microscopie confocale comme outil d'étude mécanistique

Le LIEC a fait l'acquisition récente d'un microscope confocale multi-photons équipé d'un module d'imagerie FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging*) autorisant la réalisation d'images de durées de vie. L'imagerie confocale et la spectroscopie de fluorescence résolue en temps permettront *via* (i) l'utilisation de nanoparticules fluorescentes de propriétés physicochimiques différentes, (ii) l'utilisation de sondes fluorescentes pertinentes permettant le marquage de certains compartiments cellulaires ou d'activités spécifiques et/ou (iii) l'autofluorescence de certaines molécules d'intérêt (NADH, NADPH, acides aminés aromatiques), **l'acquisition de données temporelles et spatiales** permettant de mieux comprendre les mécanismes d'action des nanomatériaux sur les bactéries.

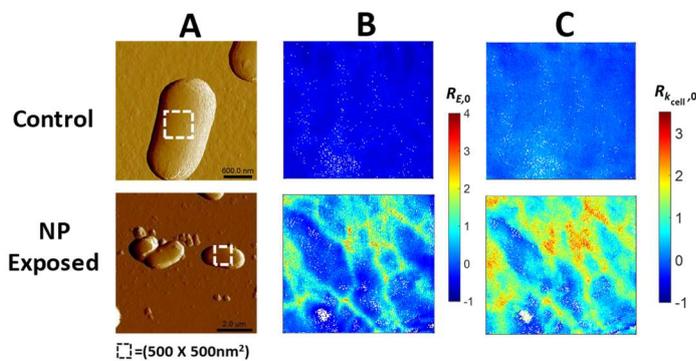
Ces dix dernières années, la microscopie confocale a permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes d'action de nombreux composés bactéricides. Les peptides antimicrobiens (*Antimicrobial peptides* : AMP) ont notamment fait l'objet d'une littérature abondante (review : Choi *et al.*, 2016 ; Buck *et al.*, 2019) et il a été démontré que certains d'entre eux se fixent spécifiquement à proximité du divisome, induisant la lyse des cellules bactériennes au moment de leur division (Kandaswamy *et al.*, 2013 ; Kurushima *et al.*, 2015). De nouvelles méthodes d'analyse permettant l'observation directe et simultanée des effets induits par les AMP sur des cellules individuelles après leur injection dans le milieu se sont également avérées très pertinentes pour

comprendre l'action de ces composés biocides sur une gamme de temps allant de la seconde à la minute. Ces approches ont permis la mise en évidence de la cascade d'événements cytotoxiques conduisant à la perte de viabilité cellulaire (*i.e.* déformation de la cellule, distribution spatiale de l'AMP, perméabilisation de la membrane, formation de ROS) (Sochacki *et al.*, 2011 ; Barns and Weisshaar, 2013 ; Bakshi *et al.*, 2014 ; Choi *et al.*, 2015). Le développement de nouvelles méthodes de marquage des AMP avec des sondes fluorescentes a permis également des avancées significatives dans le domaine en permettant notamment la localisation et la quantification des AMP adsorbés sur les cellules et/ou internalisés, ainsi que l'identification des structures cibles (paroi cellulaire, protéines intracellulaires, ADN) (Bindman and van der Donk, 2013). Le challenge avec ce type d'approche réside dans la non-altération des propriétés physicochimiques intrinsèques des AMP et de leur activité bactéricide suite au greffage périphérique du fluorochrome.

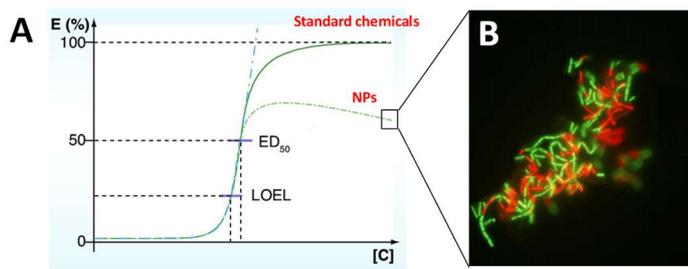
De nombreuses similitudes existent entre les mécanismes d'action des AMP et ceux associés aux nanoparticules. Notamment l'importance des interactions électrostatiques et des facteurs contrôlant ces interactions (*e.g.* composition physicochimique du milieu d'exposition) dans la phase d'adsorption des AMP sur la surface bactérienne (pouvoir bactéricide des AMP cationiques supérieur à celui des AMP anioniques), leurs effets délétères sur les membranes (déstabilisation du potentiel de membrane, perméabilisation, génération de stress oxydatif), et même pour certains AMP leur capacité à induire chez les bactéries un mécanisme d'hypervésiculation (Manning and Kuehn, 2011). De manière assez analogue aux résultats obtenus sur la souche JW3606 exposée aux NP-TiO<sub>2</sub> (*i.e.* 3 régimes de réponse distincts), certains auteurs ont mis en évidence une réponse en 3 temps (*three-step model*) chez les bactéries Gram-négatives suite à leur exposition aux AMP (Li *et al.*, 2007 ; Hartmann *et al.*, 2010). Ces 3 étapes sont 1) l'altération de la membrane externe, 2) la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et 3) la désintégration des deux membranes causant la libération du contenu cytoplasmique.

Ainsi, les différentes stratégies développées en confocale pour comprendre les effets bactéricides des AMP pourront être exploitées pour tenter de répondre à un certain nombre de questions non résolues sur la toxicité des nanomatériaux. Par exemple, comment se hiérarchisent les effets délétères (cascade d'évènements) suite à l'adsorption des nanomatériaux... est-ce le stress osmotique causé par la perméabilisation des membranes qui induit une réponse au stress oxydatif, ou bien est-ce l'émission de ROS par les nanomatériaux qui induit une perméabilisation de la membrane et la réponse au stress osmotique ? Existe-t-il des régions et/ou des éléments préférentiellement ciblés par les NP sur la surface bactérienne (*e.g.* protéines, LPS, fimbriae) ? En effet, nos précédentes observations en microscopie électronique à balayage et nos analyses AFM ont révélé respectivement une distribution hétérogène des NP sur les surfaces bactériennes (**Fig 3. C**) et des effets délétères très localisés sur la membrane (*patchy-like distribution*) (**Fig. 16**). Nos observations microscopiques ont

également mis en évidence une distribution hétérogène des NP sur les cellules bactériennes d'une même population, laissant supposer que les cellules ne sont pas toutes équivalentes face aux interactions avec les NP et donc face à leurs effets délétères. Cette hypothèse est également supportée par nos expérimentations dose-réponse sur les NP qui ont révélé que même aux plus fortes concentrations, la population n'est jamais impactée dans sa totalité (**Fig. 6 et 17**). A noter que l'agrégation/agglomération des NP dans le milieu d'exposition ne peut à elle seule totalement expliquer ce phénomène. Comme précédemment décrit, des expérimentations AFM et confocales sur cellules isolées devraient permettre de mieux expliquer un certain nombre de phénomènes observables à l'échelle de la population et de la communauté, renforçant ainsi le **changement d'échelle** entre ces différents niveaux d'organisation biologique.



**Figure 16.** *Escherichia coli* JW3596 exposée ou non au NP-TiO<sub>2</sub> (20h à 10mg/L). **A.** Images AFM en déflexion. La fenêtre 500×500 nm<sup>2</sup> représente la surface cellulaire analysée (65 536 courbes de force). **B.** Distribution spatiale des modules d'Young (élasticité) et **C.** des  $K_{cell}$  (pression de turgescence).



**Figure 17. A.** Relation dose-réponse d'un composé chimique standard et de NP-TiO<sub>2</sub> sur *E. coli* ( $E\%$  : pourcentage de cellules impactées). **B.** cellules marquées au Syto9 (viables - vertes) et à l'iodure de propidium (perméables - rouges) après exposition aux NP-TiO<sub>2</sub> (20 h à 100 mg/L).

### 3.2.2. La bioluminescence bactérienne comme proxy de toxicité

Comme discuté dans le **chapitre 2.3.5**, l'utilisation de la bioluminescence bactérienne (opéron *luxCDABE*) comme système rapporteur de l'expression des gènes présente de nombreux avantages (*i.e.* absence de background, bonne sensibilité, mise en œuvre et détection du signal aisées, réponse dynamique permettant le *real-time monitoring*, mesure en quasi-simultanée sur 96 puits) mais souffre encore à ce jour d'un manque de connaissances des mécanismes moléculaires/physiologiques à

l'origine de l'émission de lumière et d'un manque de formalismes théoriques adaptés à ces systèmes multifactoriels complexes.

Nos récentes études sur les biosenseurs luminescents *E. coli* -  $\rho ZntA$ -*LuxCDABE* répondant au Cd(II) et le couplage d'approches expérimentales à la modélisation ont permis des avancées significatives sur ces différents aspects. Ces travaux seront approfondis dans le cadre de la thèse d'Eva Delatour (début de la thèse janvier 2020 ; Direction J.F.L. Duval et C. Pagnout) avec notamment *i*) le décodage de la réponse multimodale du signal luminescent émis (1, 2, 3 modes d'émission en fonction de la composition nutritive du milieu) par le biosenseur *E. coli* -  $\rho ZntA$ -*LuxCDABE*, *ii*) l'étude des relations existantes entre spéciation/labilité du Cd(II) en solution, biodisponibilité pour le biosenseur et réponse temporelle de la luminescence, *iii*) la mise en évidence sur ce même biosenseur de proxys révélateurs d'effets toxicologiques NP-dépendants.

Dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'action bactéricides des nanomatériaux, les connaissances acquises sur les biosenseurs bactériens luminescents répondant au Cd(II), ou celles à venir dans le cadre de la thèse en cours, devraient nous permettre de mieux appréhender et analyser la réponse de biosenseurs bactériens luminescents (*E. coli* ou autres souches modèles) rapporteurs d'effets délétères (*e.g.* stress oxydatif, stress osmotique, perméabilisation de la membrane, dommage à l'ADN) ou d'activités métaboliques particulières (*e.g.* respiration cellulaire, dégradation des glucides, replication/traduction/transcription) lors de l'exposition aux nanomatériaux. Ces biosenseurs construits sur le même modèle que ceux précédemment décrits (fusion d'un promoteur aux gènes *LuxCDABE*) permettront **l'exploitation qualitative et quantitative en semi-temps réel et semi-continu de la réponse** de la cellule au stress sur plusieurs heures d'expositions. De plus, comme précédemment évoqué, l'acquisition de ces données peut se faire en quasi-simultané sur 96 échantillons (microplaque 96 puits), ce qui permettra notamment des études synchrones sur plusieurs biosenseurs et/ou dans des conditions d'expositions multivariées (*e.g.* concentrations en NP, en microorganismes, composition du milieu d'exposition). Les données acquises seront confrontées à celles obtenues en microscopie confocale et devraient ainsi nous permettre de combler un certain nombre de lacunes mécanistiques en lien avec les effets bactéricides des NP. En effet, la lourdeur des approches expérimentales précédemment déployées (cytométrie, transcriptomique, AFM, électrocinétique), la durée nécessaire à la préparation de l'exposition (obtention de cellules en phase exponentielle de croissance, préparation des NP), et les contraintes horaires imposées par le laboratoire nous ont contraint à réaliser nos mesures de toxicité après 20 h d'exposition (J+1) ; ce qui laisse une fenêtre d'observation bien trop réduite pour appréhender les effets des NP dans leur globalité.

### **3.2.3. La vésiculation comme mécanisme de résistance bactérien**

Comme discuté dans le **chapitre 2.3.3**, la vésiculation bactérienne jouerait un rôle déterminant dans la sensibilité/résistance des bactéries aux nanoparticules. En effet, la vésiculation pourrait induire une fragilisation/déstabilisation de l'enveloppe bactérienne conduisant à une sensibilité accrue des souches exposées aux NP, mais également, de manière antagoniste, pourrait limiter les effets délétères des NP en favorisant les interactions OMV-NP dans le milieu, au détriment des interactions NP-bactéries. On peut également raisonnablement penser que ce processus de vésiculation favoriserait la désorption des NP adsorbées sur les surfaces bactériennes, ce qui contribuerait également à diminuer leur pouvoir bactéricide. Ces différentes hypothèses n'ont à ce jour, et à ma connaissance, fait l'objet d'aucune validation scientifique et feront à très court terme l'objet d'études plus approfondies.

Le rôle protecteur des OMV contre les peptides antimicrobiens (AMP) et les bactériophages a récemment été mis en évidence (Manning and Kuehn, 2011 ; Manning and Kuehn, 2013). Des mutants *E. coli* présentant un phénotype d'hyper-vésiculation ont révélé une résistance accrue à la polymyxine B, à la colistine et aux bactériophages T4. Il a également été démontré que l'apport d'OMV purifiées à une culture d'*E. coli* limiterait les effets bactéricides des AMP et le pouvoir infectieux des bactériophages. Ces derniers se lient rapidement et de manière irréversible aux OMV. Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence que certains mutants d'*E. coli* présentant une altération de leurs LPS produisent significativement plus d'OMV que la souche sauvage, ce qui pourrait expliquer leur résistance aux agents antibactériens ciblant la membrane externe (Kulp *et al.*, 2015). Dans Pagnout *et al.* (2019) nous avons démontré que ces mêmes mutants (mutants *E. coli deep-rough*) présentent également une réduction de plusieurs OMP (*outer membrane proteins*) impliquées dans les mécanismes de reconnaissance/transport des bactériophages (*e.g.* FhuA impliqué dans le mécanisme de virulence des phages T7, T5, T1,  $\phi$ 80, UC-1 et de nombreux autres phages isolés de l'environnement ; BtuB, NrfA, FadL et OmpF récepteurs des phages BF23, N4, T2 et K20) et des AMP-like bactériocines produites par et létales pour *E. coli* (*e.g.* FhuA et BtuB récepteurs respectifs des colicines and microcines). J'émetts d'ailleurs ici l'hypothèse que cette réduction d'OMP observée chez ces mutants ne serait que la conséquence du processus d'hyper-vésiculation et que la délocalisation d'une fraction surfacique des membranes externes et des récepteurs/transporteurs associés sur les OMV excrétées serait à l'origine de la réduction de certaines OMP chez les mutants *deep-rough*. Ainsi, les OMV seraient en mesure de piéger les éléments potentiellement délétères pour la cellule mère de deux manières : *via* l'adsorption non spécifiques sur leur surface (interactions électrostatiques) ou *via* la fixation à des récepteurs cibles dans le cas des composés biocides récepteurs-dépendants.

Courant septembre 2021, une demande de financement sera déposée (AO EC2CO 2022) afin de répondre aux questionnements précédemment formulés. Des expérimentations seront réalisées afin de *i)* purifier, quantifier et caractériser les OMV produites par les mutants deep-rough d'*E. coli* (propriétés structurales : taille, forme, composition protéiques ; propriétés nanomécaniques : module d'Young, constante de raideur ; propriétés physicochimiques : distribution et densité de charges); *ii)* quantifier les cinétiques d'agrégation NP-OMV purifiées (analyses DLS/granulométriques) dans les milieux d'exposition ; *iii)* évaluer le rôle protecteur des OMV sur des cultures d'*E. coli* exposées aux nanoparticules *via* des co-incubations NP-bactéries-OMV purifiées à concentrations variables ; *iv)* évaluer le rôle joué par le processus de vésiculation dans la désorption des NP adsorbées sur les surfaces bactériennes (analyses confocales en temps réel et cytométrie de flux *via* l'utilisation de NP fluorescentes).

Les données physicochimiques et protéomiques obtenues sur les OMV dans le cadre de ces études devraient également permettre de mieux comprendre le rôle de ces nanostructures biologiques dans la résistance des bactéries aux bactériophages et aux peptides antimicrobiens. Une première piste de réflexion pourrait être le rôle joué par l'électrostatique dans le processus d'adsorption OMV-biocide vs. bactérie-biocide. Nos travaux ont récemment démontré une différence de charge significative entre les OMV ( $-2,5 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  dans du  $\text{KNO}_3$  10 mM) et les bactéries ( $-5 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  dans du  $\text{KNO}_3$  10 mM). Sur le plan purement électrostatique, de par leur charge nette négative, les bactériophages devraient donc être plus prompts à s'adsorber sur les OMV que les cellules mères ; ou du moins cela devrait faciliter la phase de rapprochement entre ces deux entités. A moyen terme, ces questionnements pourraient être appréhendés en collaboration avec nos collègues virologues du LCPME.

#### **3.2.4. Nanocosme microbien comme outil de diagnostique**

Une partie du **chapitre 2.3.4** du présent document était consacrée au développement d'un réseau trophique microbien standardisé pour l'évaluation de la toxicité des contaminants. Ces travaux avaient été réalisés dans le cadre de la thèse de Anne Vicente soutenue en 2019. De par sa complexité, ce système expérimental déjà très élaboré souffre encore de pertinence écologique, notamment dans le choix du protozoaire, ainsi que d'un manque de reproductibilité. Les difficultés rencontrées lors de la culture de *Chilomonas paramecium* (*i.e.* faible production de biomasse, culture non axénique) nous ont en effet contraint, également par faute de temps, à substituer ce flagellé par le cilié *Tetrahymena pyriformis* moins écologiquement réaliste. Le manque de reproductibilité serait quant à lui imputable au consortium bactérien nitrifiant. Ce consortium complexe composé de plus d'une 30<sup>ème</sup> de souches

environnementales différentes (séquençage Illumina HiSeq 2000) dérive d'un consortium 'naturel' initialement prélevé dans les filtres d'eau douce de l'aquarium de Nancy. Afin de limiter la variabilité durant les expérimentations, ce consortium nécessite une caractérisation et une standardisation plus poussée.

Un projet de création d'entreprise porté par Anne Vicente est actuellement à l'étude. Cette entreprise réaliserait du développement d'outils d'analyse et de diagnostic en écotoxicologie microbienne ainsi que des prestations de services d'évaluation de la toxicité de contaminants/substances sur micro-organismes (tests normalisés AFNOR, ISO, OCDE). Le réseau trophique microbien développé intégrerait la batterie de bioessais proposée et permettrait d'appréhender les effets toxicologiques indirects (*i.e.* effets sur des organismes en interaction trophique ou compétition) non considérés dans les tests monospécifiques.

Un financement a récemment été obtenu (Projet NeTERA, porteurs C. Pagnout & P. Bauda, 12800€) en réponse à l'AAP pré-maturation scientifique (TRL3 *Analytical or experimental proof of concept is demonstrated*) lancé par la Direction de la Recherche et de la Valorisation (DRV) et la Sous-Direction Valorisation Innovation (SDVI) de l'Université de Lorraine. Cette aide financière soutiendra les expérimentations nécessaires à la standardisation du consortium microbien nitrifiant utilisé dans le réseau trophique microbien développé. Héloïse Bazart étudiante en M2 Microbiologie à Nancy effectuera son stage de 6 mois sur cette problématique au premier semestre 2021. La standardisation du bioessai devrait nous permettre à plus long terme de nous orienter vers une démarche de normalisation ISO.

## Références

- Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E., 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *PNAS* 70, 782–786.
- Auffan M., Rose J., Wiesner M., Bottero J.-Y., 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Pollut* 157, 1127–1133.
- Auffan M., Tella M., Santaella C., Brousset L., Paillès C., Barakat M., Espinasse B., Artells E., Issartel J., Masion A., Rose J., Wiesner M.R., Achouak W., Thiéry A., Bottero J.Y., 2014. An adaptable mesocosm platform for performing integrated assessments of nanomaterial risk in complex environmental systems. *Sci Rep* 4, 5608.
- Bakshi S., Choi H., Rangarajan N., Barns K.J., Bratton B.P., Weisshaar J.C., 2014. Nonperturbative imaging of nucleoid morphology in live bacterial cells during an antimicrobial peptide attack. *Appl Environ Microbiol* 80, 4977–4986.
- Barns K.J., Weisshaar J.C., 2013. Real-time attack of LL-37 on single *Bacillus subtilis* cells. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1511–1520.
- Barron A., May G., Bremer E., Villarejo M., 1986. Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 167, 433–438.
- Bindman N.A., van der Donk W.A., 2013. A general method for fluorescent labeling of the N-termini of lanthipeptides and its application to visualize their cellular localization. *J Am Chem Soc.* 135, 10362–71.
- Bojanovic K., D'Arrigo I., Long K.S., 2017. Global transcriptional responses to osmotic, oxidative, and imipenem stress conditions in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 83, e03236-16.
- Bour A., Mouchet F., Cadarsi S., Silvestre J., Chauvet E., Bonzom J.-M., Pagnout C., Clivot H., Gauthier L., Pinelli E., 2016a. Impact of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the functions of freshwater ecosystems: a microcosm study. *Environ Sci-Nano* 3, 830–838.
- Bour A., Mouchet F., Cadarsi S., Silvestre J., Verneuil L., Baque D., Chauvet E., Bonzom J.-M., Pagnout C., Clivot H., Fourquaux I., Tella M., Auffan M., Gauthier L., Pinelli E., 2016b. Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology* 10, 245–255.
- Buck A.K., Elmore D.E., Darling L.E.O., 2019. Using fluorescence microscopy to shed light on the mechanisms of antimicrobial peptides. *Future Med Chem* 11, 2445–2458.
- Burello E., Worth A.P., 2011. A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicology* 2, 228–35.
- Calow, P. 1993. Handbook of ecotoxicology - Chapitre 1 : General principles and overview. Handbook of ecotoxicology - Volume 1. - 1-5 - Imprimé par Blackwell Scientific , Cambridge , MA, USA.
- Cheng Y.W., Chan R.C., Wong P.K., 2007. Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. *Water Res* 2007, 41, 842–852.

- Choi H., Yang Z., Weisshaar J.C., 2015. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide cm15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, e303–310.
- Choi H., Rangarajan N., Weisshaar J.C., 2016. Lights, camera, action! Antimicrobial peptide mechanisms imaged in space and time. *Trends Microbiol* 24, 111–122.
- Derjaguin B.V., Landau L.D., 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim URSS* 14, 733–742.
- Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Singh, N., 2012. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Res* 745, 104–111.
- Drejer E.B., 2015. Modelling and Analysis of Osmotic Stress in *Escherichia coli*. Ph.D thesis - Norwegian University of Science and Technology.
- Dupont M., James C.E., Chevalier J., Pagès J.M., 2007. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3190–3198.
- Duval J. F., Pagnout C., 2019. Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sens* 4, 1373–1383.
- Duval J., Pagnout C., 2020. Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters: experimental evidence and quantitative theory. *Sensors Actuat B-Chem* 309, 127751.
- Fenoglio I, Greco G, Livraghi S, Fubini B., 2009. Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO<sub>2</sub> nanoparticles that may trigger toxic responses. *Chemistry*. 15, 4614–4621.
- Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* 22, 64–75.
- Garaud M., Auffan M., Devin S., Felten V., Pagnout C., Pain-Devin S., Proux O., Rodius F., Sohm B., Giambérini L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944.
- González-Flecha B., Demple B., 1995. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270, 13681–7.
- Gunasekera T.S., Csonka L.N., Paliy O., 2008. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol* 10, 3712–3720.
- Hahn E., Wild P., Hermanns U., Sebbel P., Glockshuber R., Häner M., Taschner N., Burkhard P., Aebi U., Müller S.A., 2012. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* 323, 845–57.
- Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M.F., Gerthsen D., Ulrich A.S., 2010. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 54. 3132–3142.

- Hommais F., Krin E., Laurent-Winter C., Soutourina O., Malpertuy A., Le Caer J.P., Danchin A., Bertin P., 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40, 20–36.
- Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M., 2009. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci Total Environ* 407, 3070–2.
- Ibanez J., Litter M., Pizarro R., 2003. Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram(-) bacteria. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 157, 81–85.
- Imlay J.A., Fridovich I., 1991. Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radic Res Commun* 12, 59–66.
- Jankovic N.Z., Plata D.L., 2019. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environ Sci: Nano* 9, 2697–2711.
- Jiang W., Mashayekhi H., Xing B., 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ Pollut* 157, 1619–25.
- Jomini S., Labille J., Bauda P., Pagnout C., 2012. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicol Lett* 215, 54–61.
- Jomini S., Clivot H., Bauda P., Pagnout C., 2015. Impact of manufactured TiO<sub>2</sub> nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. *Environ Pollut* 202, 196–204
- Kandaswamy K., Liew T.H., Wang C.Y., Huston-Warren E., Meyer-Hoffert U., Hultenby K., Kline K.A., 2013. Focal targeting by human  $\beta$ -defensin 2 disrupts localized virulence factor assembly sites in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20230–20235.
- Kaweeteerawat C., Ivask A., Liu R., Zhang H., Chang C.H., Low-Kam C., Fischer H., Ji Z., Pokhrel S., Cohen Y., Telesca D., Zink J., Mädler L., Holden P.A., Nel A., Godwin H., 2015. Toxicity of metal oxide nanoparticles in *Escherichia coli* correlates with conduction band and hydration energies. *Environ Sci Technol* 49, 1105–1112.
- Kühnel D., Nickel C., 2014. The OECD expert meeting on ecotoxicology and environmental fate-towards the development of improved OECD guidelines for the testing of nanomaterials. *Sci Total Environ* 472, 347–353.
- Kulkarni H.M., Swamy Ch. V., Jagannadham M.V., 2014. Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the Antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions. *J Proteome Res* 13, 1345–1358.
- Kulkarni H.M., Nagaraj R., Jagannadham M.V., 2015. Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiol Res* 181, 1–7.
- Kulp A.J., Sun B., Al T., Manning A.J., Orench-Rivera N., Schmid A.K., Kuehn M.J., 2015. Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10, e0139200
- Kumar, A., Pandey, A.K., Singh, S.S., Shanker, R., Dhawan, A., 2011. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells, *Chemosphere* 83, 1124–1132.

- Kurushima J., Nakane D., Nishizaka T., Tomita H., 2015. Bacteriocin protein Bac11 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-cross-bridged peptidoglycan. *J Bacteriol* 197, 286–295.
- Leung Y.H., Xu X., Ma A.P., Liu F., Ng A.M., Shen Z., Gethings L.A., Guo M.Y., Djurišić A.B., Lee P.K., Lee H.K., Chan W.K., Leung F.C., 2016. Toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> to *Escherichia coli* cells. *Sci Rep* 6, 35243.
- Levin D.E., Hollstein M., Christman M.F., Schwiers E.A., Ames B.N., 1982. A new Salmonella tester strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *PNAS* 79, 7445–7449.
- Li A., Lee P.Y., Ho B., Ding J.L., Lim C.T., 2007. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1768, 411–418.
- Li M., Yin J.J., Wamer W.G., Lo Y.M., 2014. Mechanistic characterization of titanium dioxide nanoparticle-induced toxicity using electron spin resonance. *J Food Drug Anal* 22, 76–85.
- Lipovsky A., Levitski L., Tzitrinovich Z., Gedanken A., Lubart R., 2012. The different behavior of rutile and anatase nanoparticles in forming oxy radicals upon illumination with visible light: an EPR study. *Photochem Photobiol* 88, 14–20.
- Mager W.H., de Boer A.H., Siderius M.H., Voss H.P., 2000. Cellular responses to oxidative and osmotic stress. *Cell Stress Chaperones* 5, 73–5.
- Manning A.J., Kuehn M.J., 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* 11, 258.
- Manning A.J., Kuehn M.J., 2013. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 23, 131–41.
- Murray B.O., Dawson R.A., Alsharaf L.M., Winter J.A., 2020. Protective effects of *Helicobacter pylori* membrane vesicles against stress and antimicrobial agents. *Microbiology* 166, 751–758.
- Nikaido H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593–656.
- Ohshima H., 2014. Interaction of colloidal particles. In: Ohshima H. Makino K. (eds), *Colloid and interface science in pharmaceutical research and development*, Elsevier, New York, 1–28.
- 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 Surf B Biointerfaces* 92, 315–321.
- Pagnout C., Jomini S., Bauda P., 2014. Revised procedure of the bacterial reverse mutation test for genotoxic evaluation of nanoparticles, Chapter 3. In/ *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, eds L. María Sierra; I Gaivão, Springer New York.
- Pagnout C., Présent R.-M., Billard P., Rotureau E., Duval J.-F.-L., 2018. What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory *Sensors Actuat B-Chem* 270, 482–491.

- Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre E., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L., 2019. Pleiotropic effects of *rfa*-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci Rep* 9, 9696.
- Pan, X., Redding, J.E., Wiley, P.A., Wen, L., McConnell, J.S., Zhang, B., 2010. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay, *Chemosphere* 79, 113–116.
- Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A., 2018. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J Bacteriol* 200, e00792-17.
- Riether K.B., Dollard M.-A., Billard P., 2001. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *App Microbiol Biotechnol* 57, 712–716.
- Schnaitman C.A., Klena, J.D., 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* 57, 655–682.
- Seo S.W., Gao Y., Kim D., Szubin R., Yang J., Cho B.-K., Pålsson B.O., 2017. Revealing genome-scale transcriptional regulatory landscape of OmpR highlights its expanded regulatory roles under osmotic stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Sci Rep* 7, 2181.
- Simon-Deckers A, Loo S, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Menguy N, Reynaud C, Gouget B, Carrière M., 2009. Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ Sci Technol* 43, 8423–9.
- Skjolding L.M., Sorensen S.N., Hartmann N.B., Hjorth R., Hansen S.F., Baun A., 2016. A critical review of aquatic ecotoxicity testing of nanoparticles - the quest for disclosing nanoparticle effects. *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 15224–15239.
- Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H., 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol* 15, 65.
- Smirnova G.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N., 2000. The role of antioxidant enzymes in response of *Escherichia coli* to osmotic upshift. *FEMS Microbiol Lett* 186, 209–13.
- Sochacki K.A., Barns K.J., Bucki R., Weisshaar J.C., 2011. Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *PNAS* 108, e77–81.
- Sohm B., Immel F., Bauda P., Pagnout C., 2015. Insight into the primary mode of action of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics* 15, 98–113.
- Suzuki T., Ueguchi C., Mizuno T., 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 3650–3653.
- Tella M., Auffan M. Brousset L., Issartel J., Kieffer I., Pailles C., Morel E., Santaella C., Angeletti B., Artells E., Rose J., Thiéry A., Bottero J.-Y., 2014. Transfer, transformation, and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem. *Environ Sci Technol* 48, 9004–9013.
- Toyofuku M, Nomura N, Eberl L., 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17, 13–24.

Unfried K., Albrecht C., Klotz L.-O., Mikecz A.V., Grether-Beck S., Schins R.P.F., 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1, 52–71.

Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Jr, Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6, 1769–1780.

Verwey E.J.W., Overbeek J.T.G., 1948. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam.

Vicente A., Sohm B., Flayac J., Rousselle P., Bauda P., Pagnout C., 2019. Toxicity mechanisms of ZnO UV-filters used in sunscreens toward the model cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Environ Sci Pollut Res* 26, 22450–22463.

Wang Z., Wang J., Ren G., Li Y., Wang X. 2015. Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli*. *Mar Drugs* 13, 3325–3339.

Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Sayes C.M., 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 171, 99–110.

Yin J.J., Liu J., Ehrenshaft M., Roberts J.E., Fu P.P., Mason R.P., Zhao B., 2012. Phototoxicity of nanotitanium dioxides in HaCaT keratinocytes – Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 263, 81–88.

Zhang H., Ji Z., Xia T., Meng H., Low-Kam C., Liu R., Pokhrel S., Lin S., Wang X., Liao Y.P., Wang M., Li L., Rallo R., Damoiseaux R., Telesca D., Mädler L., Cohen Y., Zink J.I., Nel A.E., 2012. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS nano* 6, 4349–4368.



# ANNEXE 1

## Osmotic stress and vesiculation as key mechanisms controlling bacterial sensitivity and resistance to TiO<sub>2</sub> nanoparticles

Christophe Pagnout, Angelina Razafitianamaharavo, Bénédicte Sohm, Céline Caillet, Audrey Beaussart, Eva Delatour, Isabelle Bihannic, Marc Offroy, Jérôme F.L. Duval

Soumis le 9/11/2020 à *Nature Communications*

Etant donné l'état de soumission de cet article, merci de ne pas diffuser ce document

|                                      |                                     |                                       |  |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| <b>manuscript</b> trackingsystem     |                                     | nature<br>communications              |  |
| <a href="#">tracking system home</a> | <a href="#">author instructions</a> | <a href="#">reviewer instructions</a> | <a href="#">help</a> <a href="#">logout</a> <a href="#">journal home</a> |

### Detailed Status Information

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Manuscript #</b>         | <a href="#">NCOMMS-20-42995</a>   |
| <b>Current Revision #</b>   | 0   |
| <b>Submission Date</b>      | 9th November 20   |
| <b>Current Stage</b>        | Manuscript under consideration  |
| <b>Title</b>                | Osmotic stress and vesiculation as key mechanisms controlling bacterial sensitivity and resistance to TiO <sub>2</sub> nanoparticles  |
| <b>Manuscript Type</b>      | Article   |
| <b>Corresponding Author</b> | Prof. Jerome Duval (jerome.duval@univ-lorraine.fr) (CNRS-University of Lorraine)  |
| <b>Contributing Authors</b> | Dr. Christophe Pagnout , Dr. Angelina Razafitianamaharavo , Dr. Benedicte Sohm , Dr. Celine Caillet , Dr. Audrey Beaussart , Mrs. Eva Delatour , Dr. Isabelle Bihannic , Dr. Marc Offroy  |
| <b>Authorship</b>           | Yes   |
| <b>Abstract</b>             | Toxicity mechanisms of metal oxide nanoparticles toward bacteria and underlying role of cell surface composition are still debated. Here, the response of lipopolysaccharide (LPS)-truncated Escherichia coli K12 mutants to TiO <sub>2</sub> nanoparticles (TiO <sub>2</sub> NPs) is addressed from the molecular, cellular to population levels by transcriptomics, fluorescence-based assays, cell nanomechanics and electrohydrodynamics. LPS devoid of outer core increase cell sensitivity to TiO <sub>2</sub> NPs that operate as membrane strippers, which induces an osmotic stress that inactivates cell osmoregulation, initiates lipid peroxidation and leads to genesis of membrane vesicles. Truncation of LPS inner core triggers alone significant membrane permeabilization/depolarization, lipid peroxidation and hypervesiculation. In turn, it favors the regulation of TiO <sub>2</sub> NPs-mediated changes in cell Turgor pressure, leads to efficient vesicles-facilitated release of aberrant membrane components and mitigates remarkably TiO <sub>2</sub> NPs toxicity with the membrane vesicles acting as electrostatic baits for TiO <sub>2</sub> NPs. Altogether, we highlight new antagonistic LPS-dependent bacterial responses to nanoparticles and we evidence that destabilized membrane can originate unexpected resistance phenotype. |
| <b>Subject Terms</b>        | Biological sciences/Biophysics<br>Earth and environmental sciences/Environmental sciences/Environmental impact  |

## Résumé

L'évaluation de l'activité bactéricide des nanoparticules (NP) et la compréhension de leurs mécanismes d'action sont à ce jour au centre de nombreux questionnements scientifiques et d'enjeux économiques majeurs en santé publique, agriculture, agroalimentaire et environnement. Cela inclut d'une part la régulation/élimination de bactéries indésirables (assainissement de l'eau, lutte contre les pathogènes, conservation des produits alimentaires et cosmétiques) et d'autre part la préservation des bactéries essentielles à la vie (*e.g.* flore commensale) et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques et terrestres (*e.g.* ressource trophique, dégradation de la matière organique).

Mes travaux de recherche se sont donc intéressés à la compréhension des mécanismes régissant la toxicité des NP d'oxydes métalliques sur les bactéries, en considérant (1) le comportement de ces NP dans les milieux d'exposition (dissolution, agrégation, interaction avec les microorganismes) ainsi que les paramètres physicochimiques susceptibles d'affecter ce comportement ; (2) leurs pouvoirs bactéricides et la nature des effets délétères associés ; (3) les mécanismes d'action conduisant *in fine* à la mort cellulaire. Afin de répondre à ces différents questionnements, mes travaux associent des approches multiples et complémentaires en microscopie, biologie moléculaire, protéomique, nanomécanique et/ou électrocinétique menées conjointement à différentes échelles d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, population, communauté).

