



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Chimie, Biologie, Santé

Présentée et soutenue par Léïla MAULINE
Le 23 mars 2012

ELABORATION DE NANOPARTICULES DE SILICE BIFONCTIONNELLES
OUTILS INNOVANTS POUR L'EXPLORATION DE BIOFILMS A
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

JURY

<i>M. WONG CHI MAN</i>	<i>Directeur de recherche CNRS – Montpellier</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M.-P. FONTAINE-AUPART</i>	<i>Directrice de recherche CNRS – Orsay</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. MERCIER-BONIN</i>	<i>Chargé de recherche INRA – INSA Toulouse</i>	<i>Examineur</i>
<i>K. BOUKERMA</i>	<i>Ingénieur de recherche – Ifremer – Brest</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. GRESSIER</i>	<i>Maitre de conférences – Université de Toulouse</i>	
<i>C. ROQUES</i>	<i>Professeur – Université de Toulouse</i>	
<i>M.-J. MENU</i>	<i>Professeur – Université de Toulouse</i>	

Ecole doctorale : Sciences de la Matière
Unité de recherche : Institut Carnot CIRIMAT
Directrices de thèse : Pr. Marie-Joëlle MENU et Pr. Christine ROQUES

Remerciements

J'adresse mes remerciements à Mme BELLON-FONTAINE Marie-Pierre, directrice de recherche CNRS d'Orsay et à Mr WONG CHI MAN Michel, directeur de recherche CNRS de Montpellier pour avoir accepté de juger ce mémoire en qualité de rapporteur, à Mr BOUKERMA Kada, Ingénieur de recherche d'Ifremer de Brest pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en tant qu'examinateur et à Mme MERCIER-BONIN Muriel, chargé de recherche INRA-INSA de Toulouse pour avoir présidé mon jury de thèse.

Je remercie très sincèrement et du fond du cœur Marie-Joëlle MENU, professeur de l'Université Paul Sabatier, Christine Roques, professeur de l'Université Paul Sabatier et Marie Gressier, Maître de conférences de l'Université Paul Sabatier pour avoir dirigé mes travaux de thèse. Je leur adresse toute ma reconnaissance pour leur encadrement tout au long de ces années de thèse, pour leurs conseils judicieux et leurs aides précieuses pour la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier mes collègues du LABMI pour leur soutien et leur aide : Sophie et Christel pour m'avoir formée aux bonnes pratiques de la microbiologie et m'avoir fait découvrir le monde très particulier des biofilms !, mais aussi Julien, Alain pour leur bonne humeur, Amandine, Aurélie et Audrey. Je tiens également à remercier tout le personnel de FONDEREPHAR : Laurence, Cathy, Haouaria, Cédric...

Je tiens à remercier tous les membres du CIRIMAT (permanents et non permanents) pour leur sympathie et leur accueil qui permettent de travailler dans une atmosphère plaisante ! Merci à Adriana, Lucie, Olivier, Oana pour les bons moments passés au labo, à Audrey, Congcong, Hoa pour leur soutien lors de la rédaction de la thèse. Egalement un grand merci à Barbara DAFFOS et Pascal LENORMAND pour l'acquisition des images MET et à Marie-Claire BARTHELEMY pour les mesures de BET.

Je n'oublie pas Cécile Pouzet et Alain Jauneau à qui j'adresse mes remerciements pour m'avoir formée à la délicate technique de la microscopie confocale. Je les remercie également pour leur disponibilité et pour leur expertise lorsque j'avais des doutes concernant le marquage des biofilms par mes particules de silice luminescentes.

Je remercie vivement Sydney RIBEIRO, professeur à l'Université Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP) d'Araraquara au Brésil, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant 2 mois. Je tiens à remercier Maurício avec qui j'ai fait mes premiers spectres de luminescence et qui a suivi avec attention le travail que j'ai effectué à Araraquara ; Peter qui a

Remerciements

fait les analyses XPS sur mes particules de silice bifonctionnelles et qui m'a beaucoup aidée pour les interprétations de ces spectres. Grâce à ce séjour, j'ai fait des rencontres inoubliables, mes colocs d'Araraquara Andressa et Andreia, les filles de Paraná avec qui j'ai partagé le tereré, Luciano et Rafael.

Je remercie chaleureusement Joëlle AZEMA pour avoir cru en moi, ce qui m'a permis de faire cette thèse !

Je remercie également mes amis pour leur soutien et leurs encouragements. Merci Laina pour ta spontanéité, ta franchise et ton amitié précieuse. Mes copines de Licence, Halima et Hasnia qui m'ont soutenue dans ce projet ! Merci à Sarah, Yannick, Marie-Anne, Damien et Lara pour nos sorties mais particulièrement pour nos repas monochromatiques. C'était un des rares moments où je parvenais à oublier « temporairement » la rédaction de la thèse. Par contre l'épreuve de la caméra était rude ! Je n'oublie pas mes voisins de Thalès, devenus mes amis Ludo, Laulau et Nath.

Pour conclure, les pensées vont vers ma famille. Merci Dou pour m'avoir soutenue durant ces trois années et demie de thèse et pour avoir su trouver les mots justes quand cela était nécessaire. Merci aussi pour ta patience à (presque) toute épreuve. Je ne te remercierai jamais assez ... Je remercie mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci maman et papa pour votre soutien sans faille durant toute ma scolarité à Toulouse et pour m'avoir appris à ne jamais baisser les bras ! Merci Nounou d'avoir toujours été là pour moi, m'envoyer les fraiches de Mango FM en live ça m'a fait beaucoup de bien, j'avais l'impression d'être à la maison tous les week-ends ! Merci aussi à Sinthia, Linda et Laura pour avoir gardé le contact malgré la distance et à tout le reste de ma famille.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I - Etude bibliographique.....	4
1. Biofilms <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2. Nanoparticules de silice bifonctionnelles.....	27
3. Voies retenues pour les travaux de thèse.....	53
Chapitre II - Partie expérimentale.....	56
A - Synthèse et caractérisations des nanoparticules de silice bifonctionnelles.....	58
1. Origine des réactifs.....	58
2. Techniques de caractérisation.....	60
3. Synthèse et caractérisations du ligand et des complexes de ruthénium.....	65
4. Synthèse des nanoparticules de silice bifonctionnelles.....	69
B - Elaboration des biofilms <i>P. aeruginosa</i>	74
1. Matériels.....	74
2. Souche utilisée.....	74
3. Conservation, entretien et identification de la souche.....	74
4. Milieux de culture.....	75
5. Elaboration des biofilms <i>P. aeruginosa</i>	76
C - Exploration des biofilms <i>P. aeruginosa</i>	76
1. Préparation des suspensions de nanoparticules.....	76
2. Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules de silice luminescentes sur le biofilm par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC).....	77
3. Observation en microscopie confocale.....	77
Chapitre III - Nanoparticules de silice bifonctionnelles.....	82
1. Complexes de Ruthénium(II).....	84
2. Synthèse des nanoparticules de silice luminescentes par microémulsion inverse.....	93
3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice luminescentes.....	107
4. Propriétés de luminescence des nanoparticules en solution.....	122
5. Conclusion.....	126

Chapitre IV - Nanoparticules de silice bifonctionnelles pour l'exploration de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	128
1. Choix du milieu de culture pour l'obtention de biofilm.....	129
2. Test de cytotoxicité.....	133
3. Pénétration des nanoparticules de silice luminescentes.....	138
4. Conclusion.....	151
Conclusion et Perspectives	153
Annexes	<i>i</i>

Abréviations

ζ	Potentiel zêta
τ_{Ru}	Taux de greffage du complexe (mmol.g ⁻¹)
τ_x	Taux de greffage des organosilanes (mmol.g ⁻¹)
Ω	Rapport organosilane introduit / silice (mmol.g ⁻¹)
AE	Analyse élémentaire
APTES	Aminopropyltriéthoxysilane
ATD	Analyse thermodifférentielle
ATG	Analyse thermogravimétrique
BET	Brunauer-Emmet-Teller
bpy	Bipyridine
bpy-Si	4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl)aminométhyl-2,2'-bipyridine
DRIFT	Diffuse reflectance infrared fourier transform
SM	Spectroscopie de masse
UV	Ultra-violet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
CP	Cross-Polarization
MAS	Magic angle spinning
ppm	partie par million
XPS	Spectroscopie de photoélectrons à rayons X
DLS	Dynamic light scattering
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
TCLM	Transfert de charge Ligand-Métal
NP-5	Igepal CO-520
TX-100	Triton X-100
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
AOT	Diocylsulfocinate de sodium
TEOS	Tétraéthoxysilane
WO	water in oil
EPS	matrice polymérique extracellulaire
ConA	Concanavaline A
BBM	Bouillon biofilm modifié
TSA	Gélose Trypcase-Soja
TSB	Bouillon Trypcase-Soja

IP	Iodure de propidium
UFC	Unité formant colonies
NP	Nanoparticules

Introduction générale

Un biofilm est un mode de vie dans lequel les bactéries, ou plus généralement les micro-organismes, vivent en communauté en adhérant entre eux ainsi qu'à toutes les surfaces possibles et produisant une matrice protectrice et adhésive. Ce mode de vie est largement privilégié par les micro-organismes (plus de 90% de la population microbienne) car il leur confère une plus grande protection contre les attaques extérieures en développant une résistance accrue vis-à-vis des traitements possibles, dont les désinfectants. Ainsi une fois formés, il est difficile de les supprimer.

Les biofilms sont très souvent associés à des problèmes de santé publique. Pour illustration, 70% des infections nosocomiales sont causées par les biofilms. Le domaine industriel n'est pas en reste puisque de nombreux secteurs sont touchés. La forte implication des biofilms dans les secteurs socio-économiques exige une meilleure compréhension de leur mécanisme de résistance pour tout au moins freiner et contrôler leur développement.

Un biofilm étant une structure tridimensionnelle vivante, il est intéressant de connaître sa structure et d'étudier s'il y a une relation entre celle-ci, le développement du biofilm et sa résistance aux traitements. Afin de répondre à cette problématique, des recherches récentes consistent à utiliser des particules luminescentes. On peut supposer que des particules de taille et de propriété physico-chimiques variées présenteront des interactions différentes vis-à-vis du biofilm ; il sera alors possible de mettre en relation ces paramètres avec la pénétration, la diffusion et la répartition des particules au sein du biofilm, et *in fine* de tirer des conclusions quant au fonctionnement et au transfert dans le biofilm. La plupart des études menées font intervenir des particules luminescentes de latex, cependant ce matériau est peu adapté à un large panel de fonctionnalisations de leur surface. Les nanoparticules de silice peuvent être une alternative à ces limitations. En effet, en plus d'être biocompatible, la silice est facilement modulable pour donner des matériaux fonctionnels (luminescence, magnétisme) et ses propriétés chimiques sont telles qu'il est possible de greffer à la surface des nanoparticules un très grand nombre de fonctions chimiques. La taille nanométrique devrait aussi permettre d'explorer le biofilm de façon fine. Notons que si les nanoparticules de silice sont largement utilisées dans des applications biologiques (la bio-détection, l'imagerie cellulaire...) elles ne sont que très peu exploitées pour l'étude de biofilms. Pour mettre en œuvre des solutions innovantes pour l'étude des biofilms, des compétences pluridisciplinaires sont nécessaires.

L'objectif de cette thèse est de montrer que les nanoparticules de silice luminescentes, combinées à la microscopie confocale, sont un outil de choix pour l'étude de biofilms

bactériens. Au vu des implications en santé et dans l'industrie, nous nous sommes intéressés aux biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*. Notre démarche a été dans un premier temps de synthétiser un panel de nanoparticules bifonctionnelles de taille variée, la première fonctionnalité étant la luminescence pour assurer le rôle de sonde nécessaire à la microscopie confocale et la seconde fonctionnalité étant donnée par les propriétés de surface bien spécifiques. Dans un second temps nous avons étudié le comportement et les interactions des nanoparticules sur les biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce manuscrit s'articule autour de 4 chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique comportant deux parties, la première portée sur les biofilms et l'autre sur les nanoparticules de silice. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, la formation de biofilms bactériens ainsi que les exopolysaccharides sécrétés par *Pseudomonas aeruginosa* y sont décrits. Puis nous passons en revue les différents outils permettant d'explorer les biofilms. Enfin nous mettons l'accent sur les potentialités (biocompatibilité, luminescence, fonctionnalisation) des nanoparticules de silice pour étudier des systèmes biologiques et notamment des biofilms bactériens.

Les modes opératoires et les différentes méthodes d'analyse mises en œuvre au cours de cette étude sont présentés dans le deuxième chapitre. Dans une première partie, la synthèse des nanoparticules de silice luminescentes de tailles différentes ainsi que les différentes fonctionnalisations en surface y sont décrites. Dans une seconde partie, l'élaboration des biofilms et le mode opératoire de l'introduction des nanoparticules sont développés.

Le troisième chapitre décrit la synthèse et la caractérisation de nanoparticules de silice bifonctionnelles ; elles sont luminescentes et fonctionnalisées en surface. Les propriétés de luminescence sont apportées par un complexe métallique de ruthénium(II) et la fonctionnalisation par réaction de greffage des particules est assurée par différents organosilanes. Des particules de tailles différentes ont été élaborées, en modifiant les paramètres de synthèse, dans le but d'étudier des effets de taille sur les biofilms. Nous avons attaché une attention particulière à la caractérisation des particules en couplant différentes techniques d'analyse structurales et de surface. Ces particules montrent des propriétés de luminescence en solution très intéressantes en termes de stabilité vis-à-vis de l'eau et d'intensité d'émission.

Le quatrième chapitre décrit l'obtention des biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*, de même que les conditions optimales pour l'observation de ces biofilms en présence des nanoparticules luminescentes en microscopie confocale. Nous discutons de la localisation des particules dans les biofilms en fonction de leur taille et de leur fonctionnalisation.

Chapitre I

Etude bibliographique

1. BIOFILMS BACTERIENS A PSEUDOMONAS AERUGINOSA	5
1.1. Structuration du biofilm bactérien	6
1.1.1. Définition d'un biofilm.....	6
1.1.2. Bactérie modèle <i>P. aeruginosa</i>	6
1.1.3. Formation du biofilm	7
1.1.3.1. Transfert des bactéries vers le support.....	8
1.1.3.2. Etape d'adhésion à la surface du support.....	8
1.1.3.3. Etape de prolifération – Etape de maturation	9
1.1.3.4. Etape de détachement.....	10
1.1.3.5. Régulation.....	10
1.2. Substances extracellulaires polymériques ou matrice d'exopolymères (EPS)	11
1.2.1. Constituants majeurs de l'EPS dans un biofilm <i>P. aeruginosa</i> et leur implication dans le biofilm	11
1.2.2. Caractérisations physico-chimiques de la matrice d'exopolymères	15
1.2.3. Mise en évidence de micro-domaines dans le biofilm	17
1.3. Méthodes d'exploration <i>in situ</i> des biofilms	21
2. NANOPARTICULES DE SILICE BIFONCTIONNELLES	27
2.1. Choix du luminophore.....	28
2.1.1. Généralités sur la photoluminescence	28
2.1.2. Les luminophores	30
2.1.2.1. Les luminophores organiques	30
2.1.2.2. Les luminophores inorganiques - Complexes de métaux de transition des blocs d et f	31
2.1.2.3. Les quantum dots	34
2.1.2.4. Les nanoparticules d'oxydes dopés par des ions lanthanides.....	35
2.1.3. Choix du luminophore	35
2.2. Fonctionnalisation à cœur des nanoparticules de silice	36
2.2.1. La méthode de Stöber	37
2.2.2. Réaction en microémulsion inverse	38
2.2.2.1. Généralités sur les microémulsions	38
2.2.2.2. Incorporation de complexes de ruthénium(II) par microémulsion inverse	39
2.3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice	42
2.3.1. Liaisons covalentes pouvant être formées avec la silice	42
2.3.2. Conditions de fonctionnalisation	47
2.3.2.1. En milieu aqueux	47
2.3.2.2. En milieu organique	48
2.4. Caractérisation des nanoparticules de silice fonctionnalisées	50
3. VOIES RETENUES DANS CES TRAVAUX DE THESE	53

1. Biofilms bactériens à *Pseudomonas aeruginosa*

Un biofilm est une communauté de micro-organismes qui adhèrent entre eux et/ou sur une surface. Ils s'enrobert d'une matrice protectrice qui renforce leur résistance contre les traitements. Une fois formé, il est quasiment impossible de le détacher complètement de la surface.

Les biofilms sont à l'origine de nombreux problèmes de santé publique. Ils sont source de contaminations et se manifestent dans un grand nombre de secteurs. Les secteurs hospitaliers, médicaux et agro-alimentaires sont particulièrement touchés. La contamination des canalisations des réseaux d'eau potable, des instruments chirurgicaux (cathéters, implants, prothèses, endoscopes...) et des appareillages utilisés dans l'agro-alimentaire (laiteries, planches de découpe de viande...) fait partie des problèmes rencontrés. Les biofilms sont également fortement impliqués dans de nombreuses infections humaines plus ou moins graves comme la mucoviscidose, l'otite moyenne, les parodontites ainsi que les maladies nosocomiales.

Les effets indésirables des biofilms ne s'arrêtent pas qu'aux problèmes rencontrés en santé publique. Les biofilms provoquent une multitude de problèmes à l'échelle industrielle d'ordre économique et financier. Quelques exemples sont cités ci-dessous:

- Dans les unités de refroidissement des usines de production électrique, la présence de biofilms provoque des problèmes de colmatage conduisant à une perte de 20-30% des capacités de transfert thermique des échangeurs de chaleur.
- La détérioration des matériaux par corrosion bactérienne, qui rassemble tous les phénomènes de corrosion où les bactéries agissent soit directement soit par l'intermédiaire de substances qu'elles sécrètent. Ce phénomène est très difficile à prévoir et à contrôler et est responsable de 10% de la corrosion totale. Des maintenances régulières sont nécessaires pour éviter les détériorations prématurées des matériaux, ce qui entraîne des coûts élevés.

Les conséquences désastreuses des biofilms tant sur le plan médical qu'économique ont conduit, au niveau mondial, à la mise en place de programmes de recherche faisant intervenir différentes disciplines (microbiologie, physique, chimie, médecine...) pour comprendre leurs mécanismes d'organisation et pour prévenir leur croissance sur des surfaces solides.

Même s'il est rare de trouver dans la nature des biofilms mono-espèces, pour notre étude, le choix s'est porté sur un modèle bactérien à *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit d'un modèle couramment adopté dans les laboratoires ; de plus *P. aeruginosa* est une bactérie souvent incriminée dans les différents problèmes dont nous venons de parler.

1.1. Structuration du biofilm bactérien

1.1.1. Définition d'un biofilm

Depuis la découverte de biofilms (plaque dentaire) par Van Leeuwenhoek au 17^{ème} siècle, la définition d'un biofilm a beaucoup évolué. La définition communément admise a été proposée par Donlan et Costerton.¹

« Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, à une interface ou entre elles, **enrobées d'une substance extracellulaire polymérique que ces cellules ont produite** et qui présentent un phénotype particulier en terme de taux de croissance et de transcription de gènes que les cellules planctoniques ne possèdent pas. » Cette définition regroupe des situations très différentes depuis quelques bactéries qui adhèrent entre elles, à des amas complexes de micro-organismes de par leur architecture et leur diversité écologique importante.

La matrice extracellulaire polymérique est une pièce maîtresse dans la résistance accrue des biofilms. Sa composition et ses propriétés physiques varient en fonction des bactéries et des facteurs environnementaux. Généralement, la matrice extracellulaire est constituée d'eau et d'exopolymères bactériens (EPS) c'est-à-dire des polymères excrétés par les bactéries. Il s'agit principalement d'exopolysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques extracellulaires, de lipides, de cations divalents mais également de matières inorganiques qui peuvent être piégées provenant du milieu extérieur.

1.1.2. Bactérie modèle *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, bactérie à Gram négatif, se présente sous la forme d'un bacille fin droit et très mobile grâce à un flagelle polaire et est dépourvue de capsule et de spore. Les corps cellulaires apparaissent la plupart du temps bien isolés ou en diplobacilles, comme illustrés dans la Figure I.1. La température optimale de croissance est comprise entre 30 °C et 37 °C

¹ Donlan, R. M.; Costerton, J. W., *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15*, 167-193.

mais elle peut se développer jusqu'à 41-42 °C. En culture, *P. aeruginosa* dégage une odeur de seringa très caractéristique.

P. aeruginosa est une bactérie ubiquiste naturellement présente dans de nombreux environnements, comme les sols, les végétaux, les eaux de rivières et de mers. Ce pathogène opportuniste peut infecter une multitude d'hôtes : insectes, plantes, humains.² Elle est fréquemment rencontrée dans les milieux hospitaliers. Selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en 2001³, *P. aeruginosa* est la troisième bactérie responsable d'infections nosocomiales, spécialement chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie est également impliquée chez les patients atteints de mucoviscidose.

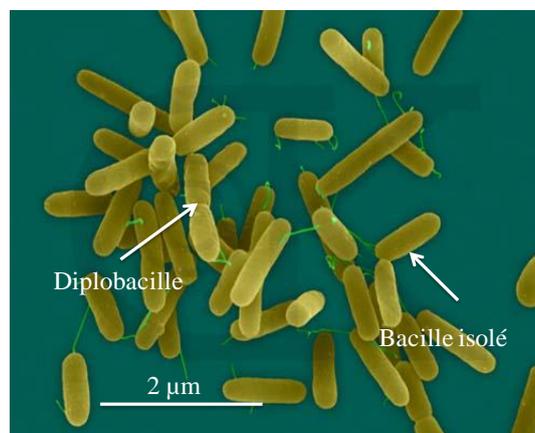


Figure I.1 – Cliché de microscopie électronique à balayage de *P. aeruginosa*
(www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp)

1.1.3. Formation du biofilm

Une des particularités du biofilm est son aptitude à se former sur des surfaces diverses et variées. **Les biofilms peuvent coloniser des surfaces très variées** comme les roches de rivières, les canalisations plastiques ou métalliques (exception pour le cuivre et l'argent), les végétaux, la peau, les muqueuses de l'organisme.

Le processus de formation des biofilms peut être décrit en cinq étapes clés (Schéma I.1) : le transfert des bactéries vers le support, l'adhésion à une surface, la formation de microcolonies, la maturation c'est à dire le développement de structures complexes et le détachement qui est la libération des bactéries pour la colonisation de surfaces adjacentes.

² Rahme, L. G.; Ausubel, F. M.; Cao, H.; Drenkard, E.; Goumnerov, B. C.; Lau, G. W.; Mahajan-Miklos, S.; Plotnikova, J.; Tan, M.-W.; Tsongalis, J.; Walendziewicz, C. L.; Tompkins, R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 8815-8821.

³ <http://www.sante.gouv.fr/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-2001.html>

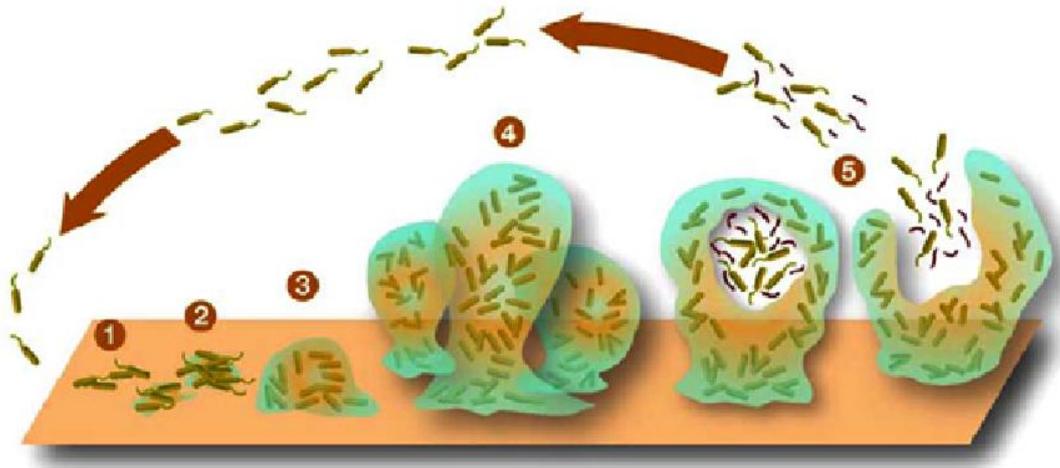


Schéma I.1 – Représentation schématique des différentes étapes de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* (Center for Biofilm Engineering de l'Université de Montana State) ; 1: Cellules individuelles à la surface. 2: L'EPS est produit et l'attachement devient irréversible. 3 et 4: Développement et Maturation de l'architecture du biofilm. 5: Libération des bactéries du biofilm.

1.1.3.1. Transfert des bactéries vers le support

L'initiation du biofilm nécessite le passage des bactéries d'un état planctonique à un état sessile, en se fixant à un support.⁴ Les bactéries peuvent entrer en contact avec le support grâce à différents moyens : la diffusion passive résultant du mouvement brownien des bactéries dans un fluide, le transport passif des bactéries via un fluide circulant (transport par convection), ou le transport actif pour les bactéries ayant des appendices générateurs de mouvement tels que les flagelles.⁵ Le flagelle permet aux bactéries de se déplacer en swimming (milieu liquide) ou en swarming (milieu semi-solide) et de se rapprocher plus facilement des surfaces notamment par chimiotactisme. Le chimiotactisme est l'ensemble des mouvements flagellaires mis en jeu pour le déplacement orienté de la bactérie vers une espèce chimique donnée et en fonction de sa concentration, par exemple le glucose. Cette capacité à orienter son déplacement n'intervient que sur de courtes distances, notamment à proximité d'une surface, lorsque le gradient de concentration en nutriments est suffisamment élevé.

1.1.3.2. Etape d'adhésion à la surface du support

Dans un premier temps, les bactéries adhèrent de façon réversible à la surface du support (quelques dizaines de nanomètres). Une simple agitation ou les forces de cisaillement du fluide peuvent éloigner la bactérie du support. Cette étape est très rapide et peut s'appliquer à tout support au contact d'un fluide transportant des bactéries. Ce sont les forces de van der

⁴ O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R., *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 49-79.

⁵ Van Loosdrecht. M. C.; Norde, W.; Zehnder, A. J., *J. Biomater. Appl.* **1990**, *5*, 91-106.

Waals, les forces électrostatiques, les interactions hydrophobes et les interactions stériques qui assurent l'adhésion réversible.⁶ L'étape suivante est l'adhésion irréversible. La transition entre l'adhésion réversible et irréversible nécessite des modifications physiologiques qui vont conduire, entre autres, à la production d'exopolymères, à l'acquisition de structures adhésives (pili, fimbriae, curli) qui au final participeront à l'adhésion des bactéries à la surface du matériau. A la fin de l'étape d'adhésion, le biofilm est fortement accroché à la surface du support grâce à la densité des bactéries et à l'EPS.

1.1.3.3. Etape de prolifération – Etape de maturation

Après l'adhésion des bactéries à une surface, celles-ci vont proliférer et adopter une structure complexe et hétérogène. Initialement sous forme de couche plus ou moins plate, l'architecture de l'amas se modifie de façon drastique pendant la maturation, faisant apparaître des zones de forte densité bactérienne (les microcolonies) et des canaux aqueux qui vont permettre la circulation de nutriments (source de carbone, O₂ dissous) et l'évacuation des déchets. Le biofilm acquiert une structure tridimensionnelle allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres, en forme de champignons, très caractéristique des biofilms de *P. aeruginosa* (Schéma I.2). Lors de ces étapes, de nombreuses modifications physiologiques et génomiques, régulées par le quorum-sensing, se produisent. Ces modifications entraînent des changements, entre autres, de la structure des biofilms, de la production d'enzymes et d'EPS et de la résistance des bactéries vis-à-vis des traitements chimiques.

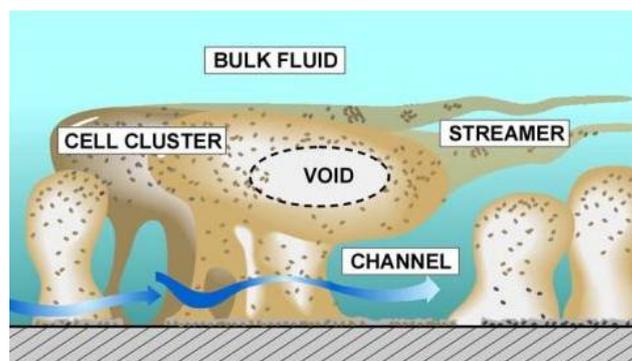


Schéma I.2 – Représentation schématique d'un biofilm constitué de zones à forte densité cellulaire (microcolonies) et de canaux aqueux (Center for biofilm engineering de l'Université de Montana State, Peg Dirckx, 1997)

⁶ Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 577-588.

1.1.3.4. Etape de détachement

L'étape de détachement est l'étape où les bactéries se libèrent de la matrice d'exopolymères, revenant sous forme planctonique pour aller coloniser de nouvelles surfaces. Le processus de détachement est une étape importante dans le cycle de vie du biofilm et joue un rôle fondamental dans la dissémination, la contamination et, sur du plus long terme, dans la survie dans d'autres milieux. Malgré l'importance du détachement, les mécanismes biologiques, chimiques et physiques de ce processus sont très peu connus. Allison *et al.*⁷ ont montré que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. fluorescens* la diminution de la quantité de nutriments entraîne la sécrétion d'une enzyme, la lyase, qui dégrade la matrice du biofilm, facilitant ainsi la libération des bactéries.

1.1.3.5. Régulation

La formation d'un biofilm est complexe et fait intervenir de nombreux systèmes de régulation. Les principaux mécanismes de régulation chez *P. aeruginosa* sont des systèmes à deux composants dont fait partie le quorum-sensing. Les systèmes à deux composants permettent grâce à la détection et à la transduction de signaux extérieurs, une réponse rapide de la bactérie face aux changements environnementaux. Le quorum-sensing est un mécanisme fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles et à coordonner leur comportement quand la densité bactérienne atteint un seuil critique. Chez *P. aeruginosa* cette communication se fait par l'intermédiaire de molécules signal, les N-acyl-homosérine lactones. Ces facteurs de régulation différencient les bactéries planctoniques des bactéries en mode biofilm et ce sont ces facteurs qui contrôlent la résistance et la pathogénéicité des bactéries au sein du biofilm et de surcroît permettent aux bactéries au sein des biofilms de s'adapter à de nombreux environnements. Wagner *et al.*⁸ ont mis en évidence le grand nombre de gènes régulés par le quorum-sensing au sein d'un biofilm *P. aeruginosa* (PAO1) ainsi que leurs fonctionnalités dans le biofilm (Figure I.2). Ils montrent que les enzymes nécessaires à la formation et au maintien des biofilms sont régulées par une quarantaine de gènes soulignant la complexité du phénomène.

⁷ Allison, D. G.; Ruiz, B.; SanJose, C.; Jaspe, A.; Gilbert, P., *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *167*, 179-84.

⁸ Wagner, V. E.; Bushnell, D.; Passador, L.; Brooks, A. I.; Iglewski, B. H., *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2080-2095.

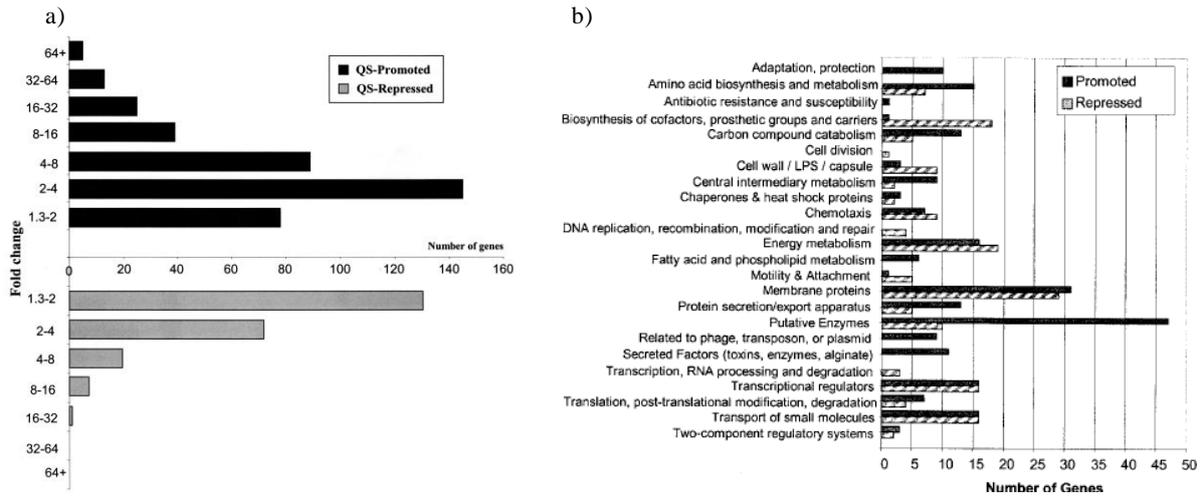


Figure 1.2 – a) Nombre de gènes régulés par le quorum-sensing ; b) les fonctions assurées par ces gènes (Wagner et al.⁸)

1.2. Substances extracellulaires polymériques ou matrice d'exopolymères (EPS)

Principalement produite par les bactéries, la matrice d'EPS est un élément crucial du biofilm car elle assure de nombreuses fonctions, entre autres, l'adhésion et le maintien de la structure du biofilm. La matrice extracellulaire est un réseau fortement hydraté constitué principalement d'exopolymères (EPS). Les exopolymères de la matrice ont longtemps été décrits comme étant des exopolysaccharides, polysaccharides excrétés par les bactéries, mais ces dernières années la caractérisation de la matrice par des techniques spectroscopiques (RMN, IR, Raman...) et chromatographiques (HPLC, CG) a permis de mettre en évidence la présence d'autres constituants dans la matrice en plus des exopolysaccharides.

1.2.1. Constituants majeurs de l'EPS dans un biofilm *P. aeruginosa* et leur implication dans le biofilm

- Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont des constituants importants ; ils assurent le maintien et la cohésion de la matrice d'exopolymères via des ponts cationiques (Ca^{2+} , Mg^{2+}) et des interactions hydrophobes. Ils représentent 50% à 90% de la matière organique dans le biofilm.⁹ Chez PAO1, les exopolysaccharides sont neutres ou polyanioniques dus à la présence d'acides uroniques tels que l'acide mannuronique et l'acide galacturonique. Le

⁹ Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P., *Molecules* **2009**, *14*, 2535-2554.

biofilm *P. aeruginosa* en produit trois : alginate, Psl et Pel, qui sont impliqués dans tous les stades de la formation, du développement et du détachement du biofilm.

➤ Alginate

L'alginate est un exopolysaccharide linéaire formé de deux monomères non répétitifs liés en position β 1→4 : le L-gulonate et le D-mannuronate dont certains sont acétylés (Schéma I.3). L'alginate des bactéries *P. aeruginosa* a été isolé et identifié en 1994 par May et Chakrabarty.¹⁰ L'alginate est globalement chargé négativement, grâce à la présence des carboxylates des deux acides dont il est formé. De ce fait la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa* est globalement chargée négativement.

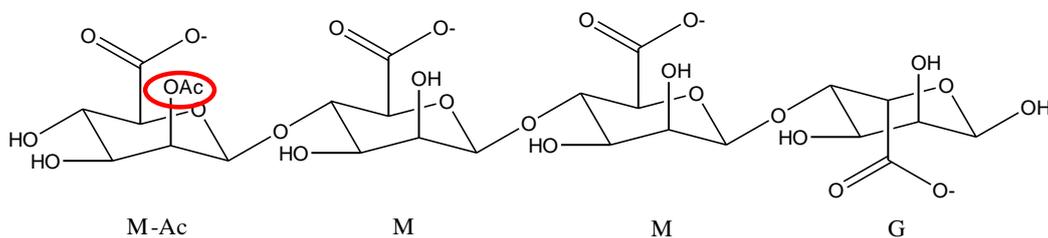


Schéma I.3 – Structure de l'alginate produit par *P. aeruginosa* ; M, mannuronate ; M-Ac, mannuronate acétylé ; G, gulonate

Nivens *et al.*¹¹ et Stappeler *et al.*¹² ont étudié le rôle de l'alginate et des groupements O-acétylés dans la formation de biofilms *P. aeruginosa*. Ils montrent que l'alginate n'est pas indispensable pour l'adhésion et la formation du biofilm puisque des bactéries *P. aeruginosa* non-mucoïdes, c'est-à-dire qui ne produisent pas ou peu d'alginate, parviennent à adhérer. Par contre l'alginate intervient surtout au niveau de l'architecture du biofilm. Les bactéries *P. aeruginosa* mucoïdes, c'est-à-dire qui surproduisent de l'alginate, forment des microcolonies très structurées par rapport aux bactéries non-mucoïdes.

Ces mêmes auteurs ont élucidé le rôle

de des groupements O-acétylés dans l'alginate en comparant des souches de *P. aeruginosa* produisant de l'alginate et de l'alginate non O-acétylé. D'un point de vue physico-chimique, les alginates O-acétylés sont plus visqueux que les alginates non O-acétylés. Cette différence se traduit au niveau des microcolonies qui sont plus structurées quand l'alginate présente les groupements O-acétylés.

¹⁰ May, T. B.; Chakrabarty, A. M., *Methods Enzymol.* **1994**, 235, 295-304.

¹¹ Nivens, D. E.; Ohman, D. E.; Williams, J.; Franklin, M. J., *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 1047-1057.

¹² Stapper, A. P.; Narasimhan, G.; Ohman, D. E.; Barakat, J.; Hentzer, M.; Molin, S.; Kharazmi, A.; Hoiby, N.; Mathee, K., *J. Med. Microbiol.* **2004**, 53, 679-690.

Différents auteurs ont montré que la résistance accrue des biofilms vis-à-vis de certains antibiotiques était intimement liée à leur structure et donc liée à la production d'exopolysaccharides dont l'alginate. Bien que les modifications physiologiques engendrées dans le biofilm jouent un rôle clé à plusieurs niveaux, chez *P. aeruginosa*, les biofilms les plus architecturés (en forme de champignons) montrent une plus grande résistance vis-à-vis des antibiotiques tels que la tobramycine, la ciprofloxacine et les tétracyclines.^{13,14,15}

Un autre exemple concerne les patients atteints de mucoviscidose, initialement colonisés par des bactéries *P. aeruginosa* non-mucoïdes qui au fil du temps adoptent un phénotype mucoïde les rendant plus résistantes et par la même, plus difficiles à éradiquer.

➤ Psl

Psl (polysaccharide synthesis locus) est composé de mannose, galactose, rhamnose, glucose et de traces de xylose, mais la structure biochimique précise n'a pas encore été déterminée.

La fonction primaire de Psl dans les souches non-mucoïdes est l'adhésion bactéries-bactéries et bactéries-support puisque les bactéries dépourvues de Psl ne parviennent pas à adhérer à une surface. Psl contribue également au maintien de la structure du biofilm dans les étapes qui surviennent après l'adhésion. Ma *et al.*¹⁶ ont montré que des biofilms matures structurés se désagrégeaient quand le gène codant pour la production de Psl n'était plus exprimé.

➤ Pel

Pel serait un exopolysaccharide riche en glucose, mais tout comme Psl sa structure exacte reste inconnue.

Colvin *et al.*¹⁷ ont montré pour une souche de *P. aeruginosa* (PA14), que Pel était impliqué dans l'initiation du biofilm et le maintien des interactions bactéries-bactéries nécessaires à la formation d'un biofilm structuré. En absence de Pel, le biofilm ne dépasse pas le stade de monocouche. L'autre fait notable est que Pel semble fournir une protection contre

¹³ Hentzer, M.; Teitzel, G. M.; Balzer, G. J.; Heydorn, A.; Molin, S.; Givskov, M.; Parsek, M. R., *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5395-5401.

¹⁴ Pamp, S. J.; Gjermansen, M.; Johansen, H. K.; Tolker-Nielsen, T., *Mol. Microbiol.* **2008**, *68*, 223-240.

¹⁵ Yang, L.; Barken, K. B.; Skindersoe, M. E.; Christensen, A. B.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T., *Microbiology (Reading, U. K.)* **2007**, *153*, 1318-1328.

¹⁶ Ma, L.; Jackson, K. D.; Landry, R. M.; Parsek, M. R.; Wozniak, D. J., *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 8213-8221.

¹⁷ Colvin, K. M.; Gordon, V. D.; Murakami, K.; Borlee, B. R.; Wozniak, D. J.; Wong, G. C. L.; Parsek, M. R., *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1001264.

les antibiotiques de type aminoglycosides. Cet EPS est globalement chargé négativement et donc les aminoglycosides chargés positivement ne parviennent pas à diffuser dans le biofilm réduisant leur action antibactérienne.

- Les protéines extracellulaires

Les protéines retrouvées dans la matrice extracellulaire jouent un rôle structural. Selon l'étude considérée, le pourcentage de protéines entrant dans la composition de la matrice varie. Deux grandes classes tirent leur épingle du jeu, les lectines et les lyases.

Les lectines sont des protéines qui se lient réversiblement à des hydrates de carbone et en général elles ne sont pas associées à des activités catalytiques. La fonction probable des lectines serait l'adhérence des cellules à l'EPS et à d'autres bactéries jouant le rôle de colle.

Les lyases/polysaccharidases sont des enzymes capables de cliver des polysaccharides conduisant à la formation d'oligosaccharides de 2 à 5 unités. La fonction biologique de ces enzymes dépend des organismes, mais généralement elles assurent deux fonctions. La première est la biosynthèse de l'EPS où les enzymes régulent la longueur de la chaîne. La seconde fonction est l'utilisation de l'EPS en cas de privation. Dans ce cas, l'activité enzymatique va couper l'EPS pour donner des molécules utilisables comme source de carbone et d'énergie.

- Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont retrouvés dans la matrice extracellulaire suite à la lyse des bactéries qui libèrent leur ADN ou par l'intermédiaire de vésicules membranaires qui transportent l'ADN vers la matrice.¹⁸ Whitchurch *et al.*¹⁸ ont montré que l'ADN extracellulaire joue un rôle dans la structuration du biofilm et que l'ADN extracellulaire était nécessaire à la formation initiale des biofilms de *P. aeruginosa* et probablement des autres biofilms.

¹⁸ Whitchurch, C. B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P. C.; Mattick, J. S., *Science (Washington, DC, U. S.)* **2002**, 295, 1487.

1.2.2. Caractérisations physico-chimiques de la matrice d'exopolymères

Pour étudier la composition de la matrice d'exopolymères, des techniques d'analyse destructrices ont été largement employées. Bien que certaines informations, notamment l'identification des gènes régulateurs, soient essentiellement accessibles après destruction du biofilm, les méthodes d'analyse non destructrices apparues très récemment sont préférables pour l'étude de la composition de la matrice. Des informations sur la composition chimique sont nécessaires pour l'optimisation des biocides. Dans cette optique, différents outils sont à disposition.

- Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est utilisée dans le domaine de la microbiologie depuis plus de 40 ans mais ce n'est que récemment, en 2006 par Bosch *et al.*¹⁹, que cette technique a été appliquée aux recherches sur la caractérisation de biofilms à *Bordetella pertussis*. L'atout majeur de la spectroscopie infrarouge est que la caractérisation chimique des groupements fonctionnels peut se faire sans détruire la structure, en ligne et en temps réel. Etant donné que le biofilm est complexe, la matrice extracellulaire n'est pas la seule à contribuer aux signaux, le cytoplasme et les membranes cellulaires y contribuent également. En soustrayant l'apport des bactéries planctoniques, Bosch *et al.*¹⁹ parviennent à identifier des acides gras, des protéines et des hydrates de carbone spécifiques du biofilm ainsi que la proportion hydrates de carbone/protéines. Cependant l'inconvénient majeur de la spectroscopie infrarouge est la nécessité de déshydrater le biofilm.

- Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman fournit aussi des informations sur la composition chimique de la matrice d'EPS mais elle est également applicable à un environnement hydraté. Cette spécificité en fait une technique largement utilisée pour les analyses biologiques. En 2008, Ivleva *et al.*^{20,21} et Wagner *et al.*²² ont étudié la composition de l'EPS et parviennent à différencier les polysaccharides, des protéines et des acides nucléiques (Figure I.3).

¹⁹ Bosch, A.; Serra, D.; Prieto, C.; Schmitt, J.; Naumann, D.; Yantorno, O., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 736-747.

²⁰ Ivleva, N. P.; Wagner, M.; Horn, H.; Niessner, R.; Haisch, C., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 197-206.

²¹ Ivleva, N. P.; Wagner, M.; Horn, H.; Niessner, R.; Haisch, C., *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2008**, *80*, 8538-8544.

²² Wagner, M.; Ivleva, N. P.; Haisch, C.; Niessner, R.; Horn, H., *Water Res.* **2009**, *43*, 63-76.

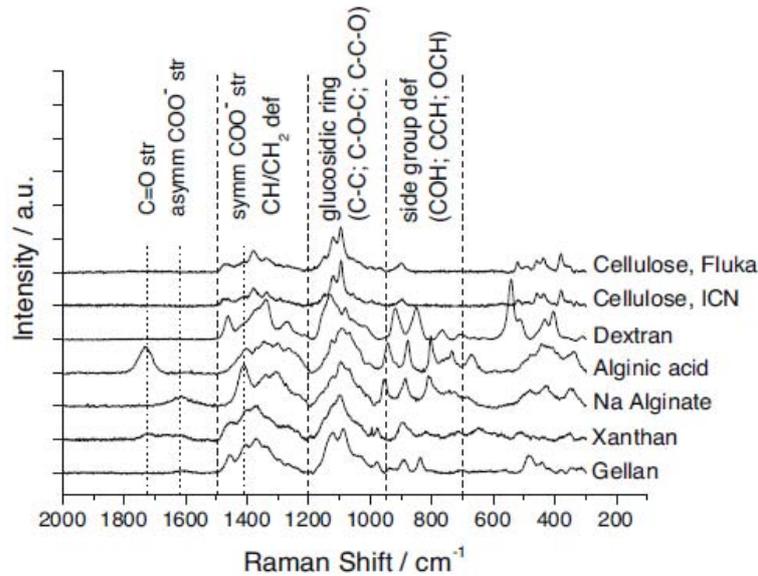


Figure 1.3 – Spectre Raman des polysaccharides spécifiques au biofilm (Ivleva et al.²⁰)

- Marquage par des sondes fluorescentes observées en microscopie confocale

L'utilisation de la microscopie confocale ces dernières années est liée au développement de nouveaux fluorochromes permettant de visualiser différents composés du biofilm, de la matrice d'EPS et des micro-domaines hétérogènes. Avec la microscopie confocale, la caractérisation qualitative et quantitative de l'EPS *in situ* est possible par l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques ciblant différents composants dans la matrice. Le marquage des exopolymères se fait généralement par des fluorochromes (fluorescéine, Alexa Fluor®, Texas Red®) conjugués à des lectines qui se lient spécifiquement par affinité à certains hydrates de carbone. De même que pour les exopolysaccharides, les protéines présentes dans le biofilm sont marquées par des luminophores conjugués à des protéases se liant spécifiquement à des protéines pour un clivage des liaisons peptidiques. Des exemples sont présentés dans le Tableau I.1.

Tableau I.1 – Exemples de quelques sondes fluorescentes pour le marquage de l'EPS

Sondes spécifiques	Molécules ciblées	Réf
Concanavoline A (lectine)	Unité α -D-mannosyl Unité α -D-glucosyl	23,24,25
Peanut Agglutinin (lectine)	Unité β -Galactose(1 \rightarrow 3)N-acétylgalactosamine	23,26
Wheat Germ Agglutinin (lectine)	Unité N-acétylglucosamine Unité Acide N-acétylneuraminique	23, 25,27
Calcofluor	Unité (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl Unité (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl	28

1.2.3. Mise en évidence de micro-domaines dans le biofilm

Lawrence *et al.*²⁹ ont mis en évidence *in situ* la présence de micro-domaines dans la matrice extracellulaire de biofilms issus d'eaux de rivières. En utilisant une grande variété de luminophores conjugués à des lectines, ils montrent que la composition de l'EPS est hétérogène en soulignant l'existence de trois domaines bien distincts d'EPS dans la microcolonie (Figure I.4). Dans le domaine intercellulaire des fucoses sont spécifiquement marqués alors qu'en extrême voisinage des bactéries et à la périphérie des bactéries, respectivement des glycoprotéines et des N-acétylglucosamides sont spécifiquement marquées. Cependant Neu *et al.*³⁰ ont montré la difficulté d'interpréter précisément la nature des résidus d'exopolysaccharides sur la seule base des luminophores conjugués aux lectines. La répartition pourrait être liée à des conditions environnementales telles que le pH.

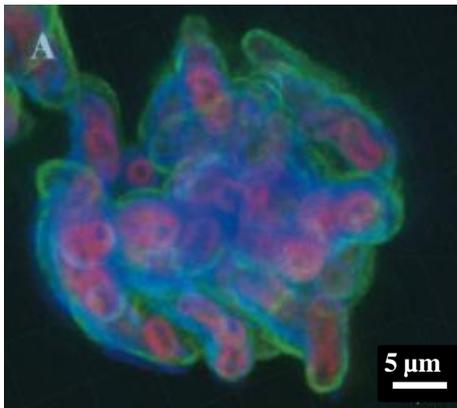


Figure I.4 – Représentation d'une microcolonie marquée par des luminophores conjugués aux lectines de *Cicer arietenum* (rouge), *Tetragonolobus purpureas* (bleu), *Solanum tuberosum* (vert) mettant en évidence les micro-domaines dans la microcolonie (Lawrence *et al.*²⁹)

²³ Johnsen, A. R.; Hausner, M.; Schnell, A.; Wuertz, S., *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3487-3491.

²⁴ Kolari, M.; Mattila, K.; Mikkola, R.; Salkinoja-Salonen, M. S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *21*, 261-274.

²⁵ Strathmann, M.; Wingender, J.; Flemming, H.-C., *J. Microbiol. Methods* **2002**, *50*, 237-248.

²⁶ Azevedo, N. F.; Vieira, M. J.; Keevil, C. W., *Water Sci. Technol.* **2003**, *47*, 155-160.

²⁷ Burton, E.; Yakandawala, N.; LoVetri, K.; Madhyastha, M. S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 1-4.

²⁸ Quintero, E. J.; Weiner, R. M., *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1897-1903.

²⁹ Lawrence, J. R.; Swerhone, G. D. W.; Kuhlicke, U.; Neu, T. R., *Can. J. Microbiol.* **2007**, *53*, 450-458.

³⁰ Neu, T.; Swerhone, G. D.; Lawrence, J. R., *Microbiology* **2001**, *147*, 299-313.

En étudiant les interactions entre les biofilms de *P. aeruginosa* et un peptide antibiotique cationique (CAP) fortement hydrophobe, Kuo *et al.*³¹ ont montré la présence de zones hydrophobes au sein du biofilm réduisant la diffusion de l'antibiotique dans le biofilm. La notion que l'alginate puisse avoir des propriétés hydrophobes semble contradictoire, étant donné que les sucres sont généralement hydrophiles et contiennent de nombreux groupements hydroxyles. Cependant des études précédentes ont montré que les polysaccharides en adoptant certaines conformations montraient des caractères hydrophobes.³² Une représentation schématique du complexe CAP-alginate est illustrée dans le Schéma I.4.

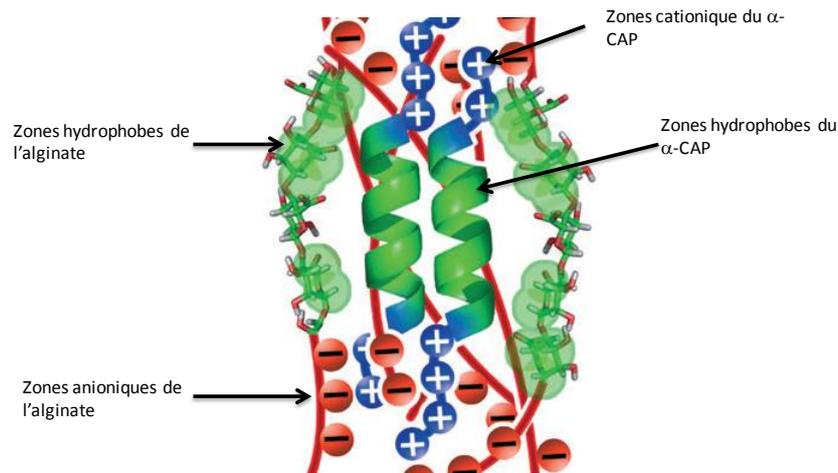


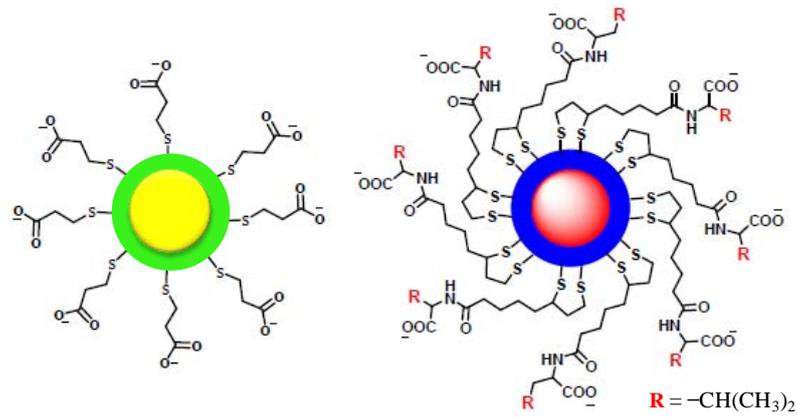
Schéma I.4 – Représentation schématique du complexe α -CAP-alginate formé par les interactions de clusters C-H avec la surface hydrophobe du peptide (Kuo *et al.*³¹)

Aldeek *et al.*³³ ont utilisé des quantum dots (CdSe/ZnS) avec des gradients d'hydrophobicité pour le marquage de micro-domaines hydrophobes de biofilms *S. oneidensis*. La surface de ces quantum dots a été modifiée soit par l'acide 3-mercaptopropionique (MPA) soit par l'acide dihydrolipoïque lié à la leucine (DHLLA-Leu). Les fonctions chimiques liées à la surface, le diamètre hydrodynamique et le caractère hydrophile/hydrophobe de ces quantum dots fonctionnalisés déterminé par la mesure de l'angle de contact sont reportés dans le Schéma I.5.

³¹ Kuo, H. H.; Chan, C.; Burrows, L. L.; Deber, C. M., *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 405-412.

³² Neal, J. L.; Goring, D. A. I., *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 3745-7.

³³ Aldeek, F.; Mustin, C.; Balan, L.; Roques-Carmes, T.; Fontaine-Aupart, M.-P.; Schneider, R., *Biomaterials* **2011**, *32*, 5459-5470.



Type de QD	CdSe(S)@MPA	CdSe/ZnS@DHLA-Leu
d_H (nm)	$8,9 \pm 2,1$	$21,7 \pm 9,2$
ζ (mV)	-33 ± 2	-36 ± 2
θ ($^\circ$)*	$100 \pm 0,7$	$90 \pm 2,5$
* mesures faites sur un support en Teflon® hydrophobe		

Schéma I.5 – Fonctionnalisation et caractérisations physico-chimiques des quantum dots utilisés par Aldeek³³

Ces auteurs ont démontré que la nature de la fonctionnalisation influence significativement les interactions des quantum dots avec le biofilm (Figure I.5). Les quantum dots les plus hydrophiles CdSe(S)@MPA se répartissent de façon homogène dans les biofilms *S. oneidensis* alors que les quantum dots CdSe/ZnS@DHLA-Leu, qui sont hydrophobes, se confinent dans des micro-domaines hydrophobes.

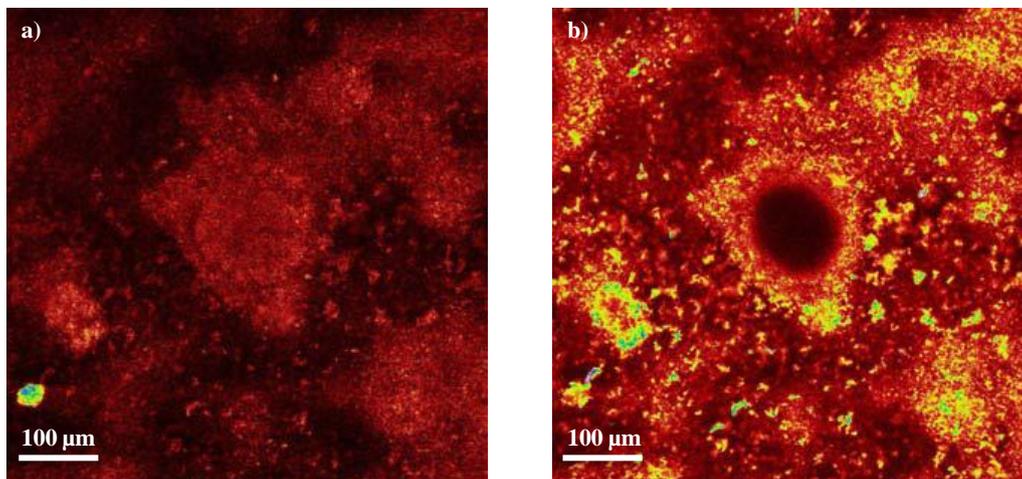


Figure I.5 – Images de microscopie confocale d'un biofilm *S. oneidensis* traité avec CdSe(S)@MPA (a) et CdSe/ZnS@DHLA-Leu (b) (Aldeek et al.³³).

Hidalgo *et al.*³⁴ ont établi à l'aide de nanoparticules de silice luminescentes sensibles au pH, la répartition de micro-zones de pH au sein des biofilms *E. coli*. Ces particules pH-

³⁴ Hidalgo, G.; Burns, A.; Herz, E.; Hay, A. G.; Houston, P. L.; Wiesner, U.; Lion, L. W., *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7426-7435.

dépendantes sont élaborées en incorporant un fluorochrome sensible au pH à la surface des nanoparticules et un fluorochrome insensible au pH au cœur des nanoparticules, la fluorescéine et le Cy5 respectivement (Figure I.6a). Cette association permet de quantifier le pH local en comparant les intensités d'émission des deux formes du fluorochrome (Figure I.6b).

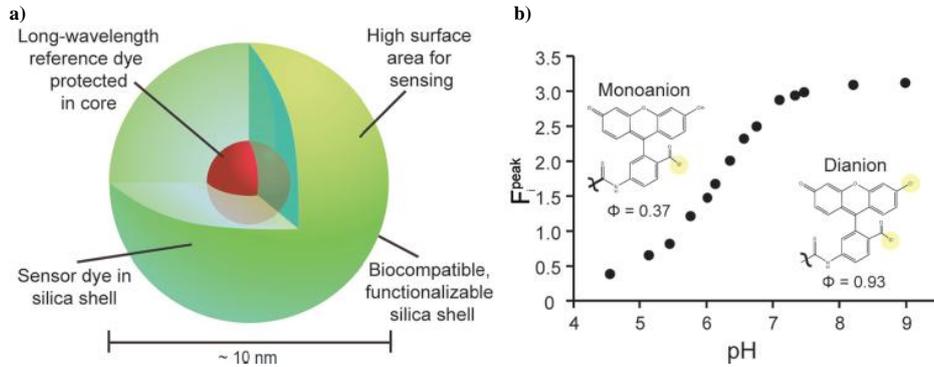


Figure I.6 – a) Représentation schématique montrant une structure cœur/coquille ; b) Emission de la fluorescéine collectée à des pH connus allant de 4,5 à 9,0 (Hidalgo et al.³⁴)

Parmi les particules de silice testées (10, 30 et 70 nm) seules les particules de 10 nm permettent une bonne répartition dans le biofilm à *E. coli*. Les auteurs parviennent en couplant la microscopie confocale avec les nanoparticules de silice à faire une tomographie indiquant avec précision les valeurs du pH au sein du biofilm. Il s'avère que la répartition, en termes de pH, est hétérogène mettant en évidence des microenvironnements dans les biofilms à *E. coli*. Les valeurs de pH sont comprises entre 5,1 et 7,3 (Figure I.7). Il s'agit à notre connaissance de la seule étude employant des nanoparticules de silice lumineuses pour l'exploration des biofilms.

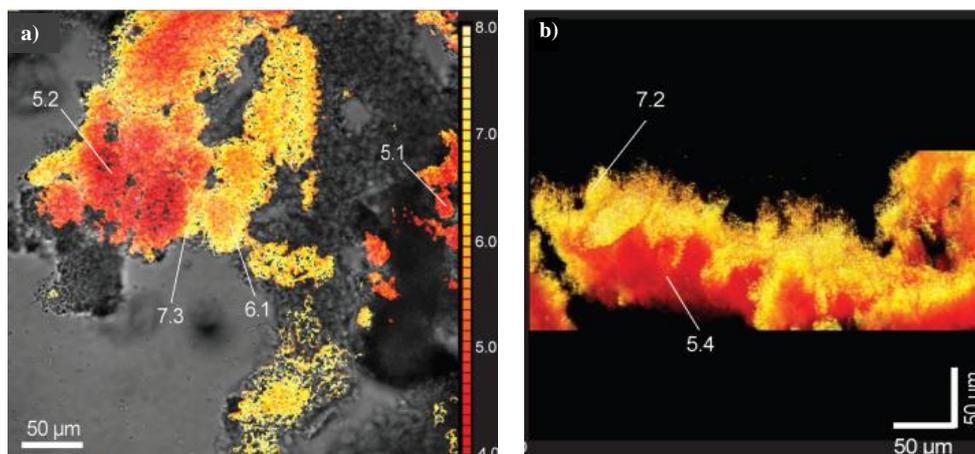


Figure I.7 – a) Image de microscopie confocale et b) Projection volumétrique de biofilms montrant la variation locale du pH dans un biofilm *E. coli* (Hidalgo et al.³⁴)

1.3. Méthodes d'exploration *in situ* des biofilms

- Détermination de la concentration d'espèces dissoutes dans le biofilm : les microélectrodes

Les techniques basées sur les microélectrodes ont été largement utilisées pour détecter et quantifier des espèces chimiques présentes dans les systèmes biologiques. Lewandowski *et al.*³⁵ ont tracé le profil de concentration de l'oxygène dissous dans un biofilm mixte non identifié (Figure I.8) montrant qu'à la base du biofilm la concentration de dioxygène dissous était nulle et qu'elle augmentait en se déplaçant vers la surface, montrant que les cellules situées à la base du biofilm ne consomment pas de dioxygène contrairement aux cellules situées en surface. Cette tendance est corrélée avec la densification du biofilm, en effet la base d'un biofilm est plus dense que son sommet.

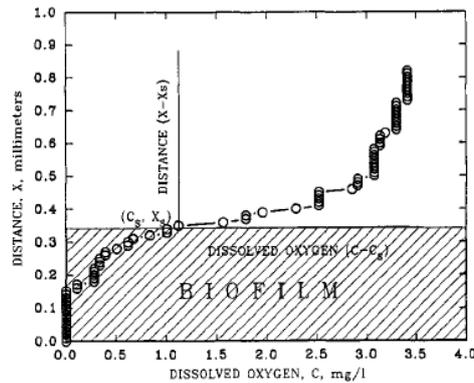


Figure I.8 – Profil de la concentration en oxygène dissous dans un biofilm mixte (Lewandowski *et al.*³⁵)

Dans le but de comprendre des processus chimiques complexes ayant lieu dans les biofilms comme la nitrification (transformation de l'ammoniac en nitrate) ou l'oxydation des composés sulfures, Okabe *et al.*³⁶ et Garci-de-Lomas *et al.*³⁷ se sont aidés de microélectrodes sensibles à différents éléments chimiques.

Cependant l'inconvénient majeur des microélectrodes est que la résolution spatiale est limitée à la taille de la sonde. De plus l'insertion de la microélectrode perturbe indéniablement le biofilm localement.

³⁵ Lewandowski, Z.; Altobelli, S. A.; Fukushima, E., *Biotechnol. Progr.* **1993**, *9*, 40-45.

³⁶ Okabe, S.; Satoh, H.; Watanabe, Y., *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3182-3191.

³⁷ Garcia-de-Lomas, J.; Corzo, A.; Carmen Portillo, M.; Gonzalez, J. M.; Andrades, J. A.; Saiz-Jimenez, C.; Garcia-Robledo, E., *Water Res.* **2007**, *41*, 3121-3131.

- Détermination de la structure du biofilm *in situ*: microscopie confocale

La microscopie confocale a radicalement transformé l'observation des biofilms par des coupes optiques nettes, notamment pour l'étude dans les épaisseurs du biofilm. La microscopie confocale s'est avérée être un outil de choix pour étudier et comprendre la structure et l'organisation des biofilms. En effet, elle permet d'examiner des biofilms *in situ* et en temps réel. Ceci n'est pas possible avec les microscopies électroniques qui nécessitent la déshydratation des échantillons, les structures hautement hydratées étant incompatibles avec le vide appliqué. La microscopie confocale permet de travailler avec des biofilms faisant plusieurs centaines de micromètres d'épaisseur. Les problèmes liés à la limitation d'épaisseur peuvent être palliés par l'utilisation de la microscopie confocale à deux photons. La microscopie confocale fournit des images fidèles de la structure du biofilm du fait que le biofilm reste complètement hydraté et attaché à son support. L'acquisition des sections d'images en deux dimensions permet la reconstitution tridimensionnelle du biofilm, montrant des microcolonies et la présence de canaux (Figure I.9). De nos jours, il est possible de rajouter d'autres dimensions comme le temps. Grâce à ces nombreux avantages, la microscopie confocale est devenue une technique incontournable et très répandue pour l'étude *in situ* de biofilms.

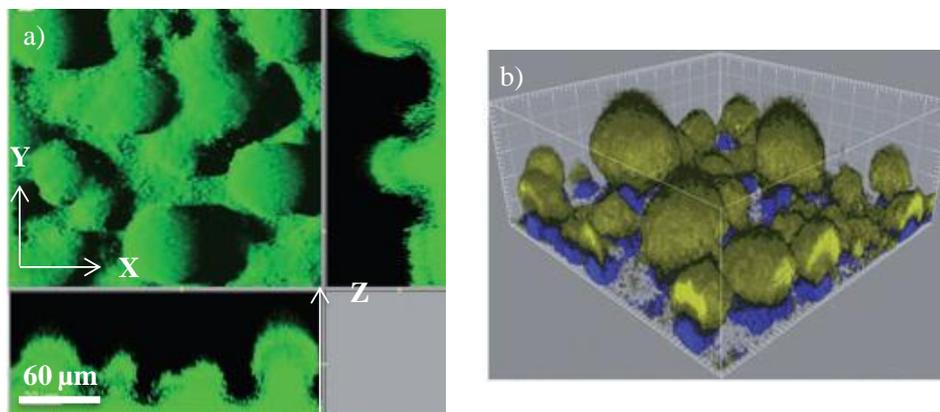


Figure I.9 – a) Microscopie confocale d'un biofilm *P. aeruginosa* PAO1 de 4 jours – b) Reconstitution en 3D d'un biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 (Barken et al.³⁸)

- Détermination de la distribution spatiale des particules

Drury et al.^{39,40} ont étudié le transport des particules de latex lumineuses de 1 µm dans un biofilm de *P. aeruginosa*. Les particules de latex sont introduites dans des biofilms jeunes (3

³⁸ Barken, K. B.; Pamp, S. J.; Yang, L.; Gjermansen, M.; Bertrand, J. J.; Klausen, M.; Givskov, M.; Whitchurch, C. B.; Engel, J. N.; Tolker-Nielsen, T., *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 2331-2343.

³⁹ Drury, W. J.; Stewart, P. S.; Characklis, W. G., *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 111-17.

jours, 15 μm) et matures (6 jours, 30 μm) et la distribution spatiale est déterminée par cryo-section. Dans les biofilms jeunes, les particules pénètrent dans tout le biofilm sans distribution spatiale particulière tandis que dans les biofilms de 6 jours, les particules se localisent préférentiellement près de la surface des biofilms c'est-à-dire à environ 25-30 μm .

Okabe *et al.*⁴¹ ont étudié la distribution spatiale de microparticules de latex luminescentes dans des biofilms mixtes matures. Pour cela, des nanoparticules de latex modifiées par des groupements carboxylate de 1 μm sont introduites pendant 24 heures, en circuit fermé, dans un biofilm âgé de 49 jours de 360 μm d'épaisseur. La distribution spatiale est déterminée au bout de 23, 60, 90, 120 et 1440 min par dénombrement direct des particules. Il s'avère qu'au bout de 23 min, les particules pénètrent dans tout le biofilm. La densité des particules près de la surface augmente graduellement avec le temps alors qu'à la base du biofilm, la densité des particules reste inchangée. La distribution spatiale n'évolue plus au bout de 90 min indiquant qu'un équilibre est atteint. Les biofilms étant considérés comme un gel formé d'un réseau polymérique, une pénétration aussi rapide nécessite un transport autre que la diffusion moléculaire, un transport convectif via des canaux d'eau et de pores. La distribution spatiale pourrait s'expliquer par une densité bactérienne plus élevée à la base qu'à la surface du biofilm.

Les avancées récentes en microscopie photonique rendent possibles l'exploration de la structure dynamique des biofilms notamment par l'analyse de la diffusion ou l'interaction moléculaire dans les biofilms. Ces techniques couplées à la microscopie confocale s'avèrent être très performantes.

- Détermination de la diffusion ou de l'interaction moléculaire dans le biofilm par imagerie de fluorescence: vélocimétrie, Spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF), Spectroscopie par retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Stoodley *et al.*⁴² et de Beer *et al.*⁴³ ont été les premiers à mesurer la vitesse du fluide au sein d'un biofilm en utilisant la technique vélocimétrie par suivi des microparticules de latex luminescentes de 1 μm , couplée à la microscopie confocale. Dans un biofilm mixte et hétérogène, ils parviennent à déterminer la vitesse maximale atteinte dans les canaux, allant

⁴⁰ Drury, W. J.; Characklis, W. G.; Stewart, P. S., *Water Res.* **1993**, *27*, 1119-1126.

⁴¹ Okabe, S.; Yasuda, T.; Watanabe, Y., *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *53*, 459-469.

⁴² Stoodley, P.; deBeer, D.; Lewandowski, Z., *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2711-2716.

⁴³ de Beer, D.; Stoodley, P.; Lewandowski, Z., *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 636-641.

de 0,002 à 0,03 m/s. Ils montrent également que dans les amas cellulaires, les particules sont stagnantes. Ces mesures informent sur la nature du transport qui peut avoir lieu dans les biofilms. Dans les canaux, on observe une combinaison de transport convectif et de diffusion tandis que dans les amas cellulaires la diffusion aurait lieu uniquement.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence est une technique non-invasive et très sensible, qui est basée sur l'analyse des intensités de fluctuations présentes dans les signaux de fluorescence émis par un faible nombre de molécules fluorescentes dans un micro-volume. Ces fluctuations peuvent être quantifiées par auto-corrélation temporelle de l'intensité du signal $g(\tau)$, donnant des informations sur **la diffusion** des fluorophores à l'intérieur du biofilm.

Guiot *et al.*⁴⁴ ont utilisé avec succès la spectroscopie de corrélation de fluorescence pour caractériser la pénétration et la diffusion de nanoparticules de latex fluorescentes dans un biofilm à *Lactococcus lactis* ayant une faible concentration en EPS et un biofilm à *Stenotrophomonas maltophilia* ayant une forte concentration en EPS. Les caractéristiques des particules de latex utilisées sont reportées dans le

Tableau I.2.

Tableau I.2 – Taille et potentiel zêta des particules de latex – Potentiel zêta du biofilm *S. maltophilia*

Fonctionnalisation	Diamètre (nm)	ζ (mV)
Billes de latex modifiées par des groupements carboxylates	55	-51 ± 5
Billes de latex modifiées par des groupements carboxylates	14	-44 ± 5
Billes de latex modifiées par des groupements amines	13,5	+28 ± 3
<i>S. maltophilia</i> (biofilms)	-	-7 ± 3

Les mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence sont réalisées dans différentes zones du biofilm (Figure I.10). Ces mesures montrent que la diffusion brownienne au sein du biofilm dépend de la taille et de la charge de surface des nanoparticules et de la présence d'EPS. Quoi qu'il en soit, les particules chargées négativement parviennent à diffuser dans les biofilms même si la diffusion est ralentie pour les plus grosses particules (55 nm) ; de même, plus la quantité d'EPS est importante et plus la diffusion des particules est ralentie. Cette

⁴⁴ Guiot, E.; Georges, P.; Brun, A.; Fontaine-Aupart, M. P.; Bellon-Fontaine, M. N.; Briandet, R., *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 570-578.

technique montre également que les particules de latex chargées positivement ne parviennent pas à diffuser dans ces biofilms du fait des interactions électrostatiques, les biofilms choisis dans le cadre de cette étude étant globalement chargés négativement ($\zeta = -7$ mV).

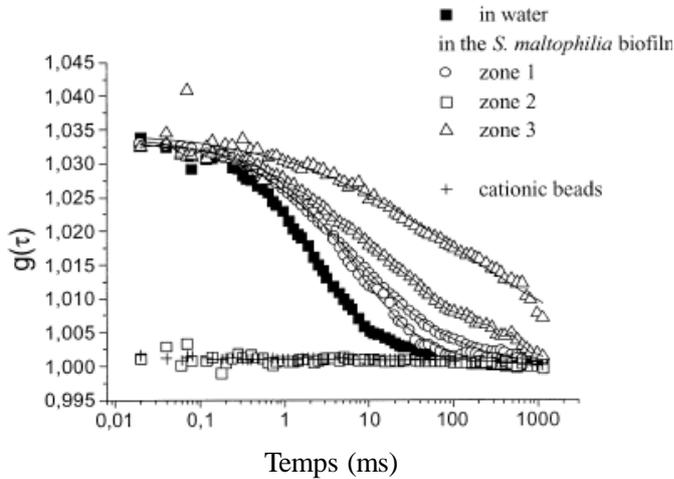


Figure 1.10 – Courbes de spectroscopie par corrélation pour des billes de latex anioniques de 14 nm dans trois zones distinctes d'un biofilm de *S. maltophilia* (Guiot et al.⁴⁴)

La technique FRAP est une technique non-invasive qui consiste à exposer une petite zone du biofilm contenant des molécules fluorescentes à un pulse intense de lumière provoquant le photobleaching des molécules fluorescentes dans cette zone. La diffusion des molécules fluorescentes est déterminée en mesurant le taux de recouvrement de fluorescence provenant de la diffusion de nouvelles molécules fluorescentes provenant de zones non irradiées (Schéma I.6).

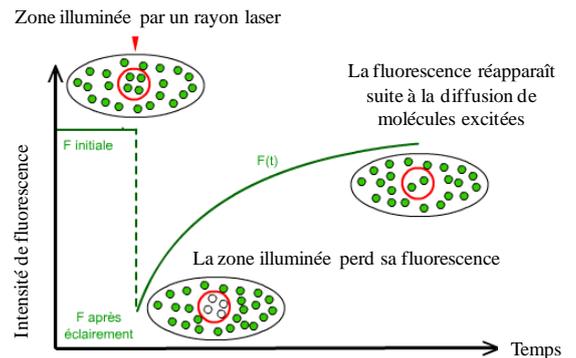


Schéma I.6 – Principe du FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

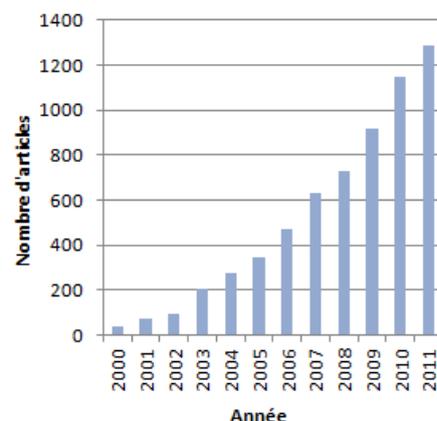
Bryers *et al.*⁴⁵ ont utilisé cette technique pour démontrer que les biofilms sont des entités biologiques hétérogènes. Ils parviennent à faire une cartographie reportant les coefficients de diffusion du dextran rendu fluorescent dans tout le biofilm. Ces résultats montrent que le coefficient de diffusion varie drastiquement d'une zone à l'autre sur de très faibles distances que ce soit verticalement (profondeur) ou horizontalement (parallèle au substrat) dans le biofilm.

⁴⁵ Bryers, J. D.; Drummond, F., *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 60, 462-473.

L'exploration de biofilms, notamment en termes de structure tridimensionnelle, et de limitations de transfert, nécessite la mise au point de nouveaux outils originaux et performants et plus discriminants. Les particules de latex ont été largement utilisées pour explorer les biofilms. Or les particules de latex sont peu adaptées quand il s'agit de modifier leur surface. Dans la seconde partie de l'étude bibliographique est présenté l'intérêt de travailler avec des nanoparticules de silice dans les milieux biologiques. Hormis Hidalgo *et al.*³⁴ aucune étude sur les biofilms impliquant des nanoparticules de silice n'a été réalisée. Notre objectif est donc d'élaborer des nanoparticules de silice dont la taille est inférieure à 100 nm, avec des propriétés de surfaces variées, comme outils permettant d'explorer les biofilms.

2. Nanoparticules de silice bifonctionnelles

Depuis quelques années l'engouement pour les nanoparticules de silice est grandissant. L'histogramme 1 permet d'illustrer l'évolution du nombre d'articles scientifiques consacrés aux nanoparticules de silice entre 2000 et 2011. Le secteur de la biologie n'est pas en reste. En effet les nanoparticules de silice **magnétiques** trouvent des applications dans l'imagerie à résonance magnétique (IRM) en augmentant le contraste d'images^{46,47} et dans l'hyperthermie localisée⁴⁸; les nanoparticules de silice **luminescentes** sont d'excellents candidats pour l'imagerie cellulaire^{49,50}, la détection ultrarapide des bactéries pathogènes^{51,52}, la détection de cellules cancéreuses.⁵³⁻⁵⁵



Histogramme 1.1 – Evolution du nombre d'articles traitant des nanoparticules de silice luminescentes entre 2000 et 2011

Comparé aux luminophores organiques couramment employés pour le bio-marquage, le succès des nanoparticules de silice luminescentes s'explique par les nombreux avantages qu'elles offrent. Tout d'abord, la matrice de silice apporte une protection contre les phénomènes de photoblanchiment⁵⁶ et de photo-quenching, problèmes majeurs couramment rencontrés avec les sondes luminescentes traditionnelles. Un autre intérêt de travailler avec les nanoparticules luminescentes est l'effet de concentration puisque une nanoparticule peut renfermer plusieurs centaines voire des milliers de molécules. De cette manière, la détection est facilitée et la sensibilité est meilleure. Le troisième aspect qui n'est pas le moindre est la possibilité de fonctionnaliser le cœur et la surface des nanoparticules de silice avec une

⁴⁶ Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8438-8441.

⁴⁷ Zhang, F.; Braun, G. B.; Pallaoro, A.; Zhang, Y.; Shi, Y.; Cui, D.; Moskovits, M.; Zhao, D.; Stucky, G. D., *Nano Lett.* **2011**.

⁴⁸ Julian-Lopez, B.; Boissiere, C.; Chaneac, C.; Grosso, D.; Vasseur, S.; Miraux, S.; Duguet, E.; Sanchez, C., *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1563-1569.

⁴⁹ Voisin, P.; Ribot, E. J.; Miraux, S.; Bouzier-Sore, A.-K.; Lahitte, J.-F.; Bouchaud, V.; Mornet, S.; Thiaudiere, E.; Franconi, J.-M.; Raison, L.; Labrugere, C.; Delville, M.-H., *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1053-1063.

⁵⁰ Yang, Y.; Yan, X.; Cui, Y.; He, Q.; Li, D.; Wang, A.; Fei, J.; Li, J., *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 5731-5737.

⁵¹ Zhao, X.; Hilliard, L. R.; Mechery, S. J.; Wang, Y.; Bagwe, R. P.; Jin, S.; Tan, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15027-15032.

⁵² Wang, Z.; Miu, T.; Xu, H.; Duan, N.; Ding, X.; Li, S., *J. Microbiol. Methods* **2010**, *83*, 179-184.

⁵³ Santra, S.; Zhang, P.; Wang, K.; Tapeç, R.; Tan, W., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4988-4993.

⁵⁴ Herr, J. K.; Smith, J. E.; Medley, C. D.; Shangguan, D.; Tan, W., *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2918-2924.

⁵⁵ Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Goswami, L. N.; Bonoiu, A. C.; Bergey, E. J.; Trampusch, K. M.; Maitra, A.; Prasad, P. N., *ACS Nano* **2008**, *2*, 449-456.

⁵⁶ Zhou, X.; Zhou, J., *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5302-5312.

grande variété de molécules (biomolécules, polymères, complexes métalliques...) par interactions électrostatiques et par liaisons covalentes. Ceci est rendu possible grâce à la présence dans les particules de silice des fonctions silanols et siloxanes essentiellement en surface.

Par exemple des nanoparticules de silice sont fonctionnalisées par l'acide folique pour la vectorisation spécifique des médicaments⁵⁷ dans les cellules cancéreuses car elles surexpriment à leur surface des récepteurs à acide folique.

En résumé la possibilité de modifier le cœur et la surface des nanoparticules de silice (Schéma I.7), dont la taille peut être contrôlée, fait de ces dernières de véritables plateformes permettant de combiner différentes propriétés, ce qui n'est pas réalisable par exemple avec des particules de latex. Tous ces avantages en font d'excellents candidats pour les applications biologiques.

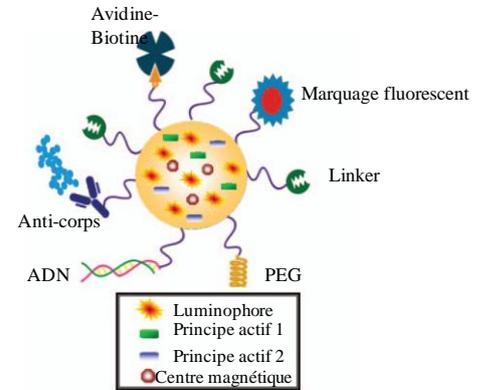


Schéma I.7 – Nanoparticules de silice multifonctionnelles (Wang et al.⁵⁸)

2.1. Choix du luminophore

2.1.1. Généralités sur la photoluminescence

Les phénomènes de luminescence sont connus depuis l'Antiquité et des exemples sont rapportés dans différentes mythologies (au travers des vers luisants et des lucioles). En 1603, Vincenzo Cascariolo fabrique la pierre de Bologne qui est considérée comme le premier matériau luminescent synthétique. Après avoir calciné des pierres, il constate avec surprise que lorsqu'elles sont exposées à la lumière du Soleil, elles continuent de luire dans l'obscurité. Mais ce n'est que vers la fin du 19^{ème} siècle que E. Wiedemann introduit pour la première fois le terme luminescence.

La luminescence est la propriété qu'ont certaines molécules à restituer **sous forme de photons** une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation qui peut avoir plusieurs origines. A chaque type d'excitation correspond une dénomination particulière de la luminescence. Une excitation causée par une réaction électrochimique donnera lieu à l'électrochimiluminescence tandis qu'une excitation causée par la lumière est la photoluminescence.

⁵⁷ Barbé, C.; Bartlett, J.; Kong, L.; Finnie, K.; Lin, H. Q.; Larkin, M.; Calleja, S.; Bush, A.; Calleja, G., *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2004**, *16*, 1959-1966.

⁵⁸ Wang, L.; Zhao, W.; Tan, W., *Nano Res.* **2008**, *1*, 99-115.

Il existe deux sortes de photoluminescence : la fluorescence et la phosphorescence. Le Schéma I.8 illustre ces deux phénomènes. Au cours du processus de fluorescence, l'émission d'un photon se produit à partir d'un **état singulet**. La durée de vie de luminescence est très courte entre 10^{-10} et 10^{-7} secondes. Quant au processus de phosphorescence, l'émission se produit à partir d'un **état triplet**. La désactivation par phosphorescence est interdite par les règles de sélection ce qui explique que cette désexcitation soit relativement lente comprise entre 10^{-6} et 1 seconde. Bien qu'interdit, le passage à l'**état triplet** est favorisé par une interaction spin-orbite augmentée au voisinage d'atomes lourds.

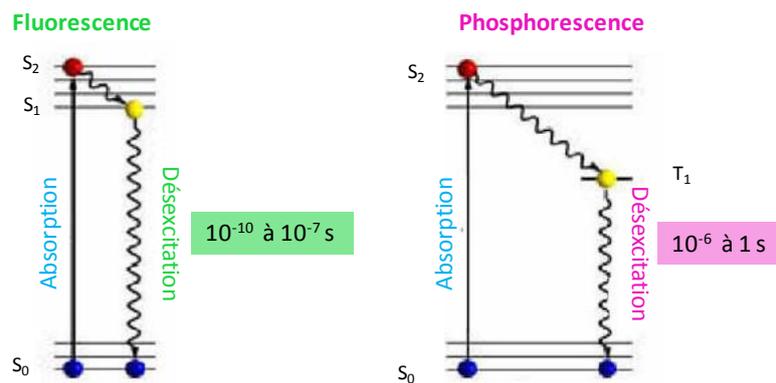


Schéma I.8 – Principe simplifié de la photoluminescence

Plusieurs mesures photo-physiques peuvent être utilisées pour définir les caractéristiques et l'efficacité d'une sonde optique.

- λ_{exc} max et λ_{em} max sont les longueurs d'onde du maximal d'excitation et d'émission d'une sonde optique. Ces valeurs sont caractéristiques de la sonde optique.
- Le décalage de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) donné par la formule suivante $\Delta\bar{\nu} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 10^7 \times (1/\lambda_{exc} - 1/\lambda_{em})$ est la différence d'énergie séparant le maximum d'excitation et d'émission. Le décalage en longueur d'onde dépend de la matière et est caractéristique de la sonde optique: il ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation.
- Le rendement quantique (Φ) compris entre 0 et 1 caractérise la capacité du luminophore à re-émettre sous forme de lumière, l'énergie absorbée. Il est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.
- Le coefficient d'extinction molaire ϵ rend compte de la capacité de la sonde optique à absorber la lumière, à une longueur d'onde donnée λ .

- La réponse de la sonde optique est définie par le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire de la sonde : $\Phi \times \epsilon$. Cette valeur est la plus pertinente pour caractériser l'efficacité d'un luminophore puisqu'elle tient compte du phénomène d'absorption. Ramené au volume de la particule, ce produit est la brillance du marqueur.
- La durée de vie des états excités (τ) représente le temps de séjour moyen du luminophore dans son état excité, la gamme de durée est comprise entre 10^{-9} s à la seconde.

2.1.2. Les luminophores

La propriété de luminescence des nanoparticules de silice est apportée par l'immobilisation de luminophores à la surface ou à l'intérieur de la matrice. Le système ainsi formé émettra dans le même domaine que le luminophore sélectionné. Il existe essentiellement 3 sortes de luminophores, les luminophores organiques, inorganiques (quantum dots, sels et oxydes de terres rares) et les complexes métalliques (métaux de transition d et f).

2.1.2.1. Les luminophores organiques

Les luminophores organiques sont généralement des molécules planes et cycliques qui possèdent des liaisons π , elles constituent généralement des noyaux aromatiques conjugués. Les plus connues sont la fluorescéine et les rhodamines présentées dans le Schéma I.9. Ces molécules ont d'excellents rendements quantiques ($\Phi > 0,8$), un coefficient d'extinction molaire élevé ($100\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) et une durée de vie de l'état excité faible de l'ordre de la nanoseconde. Cependant les principaux inconvénients de ces molécules sont qu'elles sont très peu photo-stables et qu'elles ont un faible décalage de Stokes (Figure I.11) alors que la détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que le décalage de Stokes est grand.

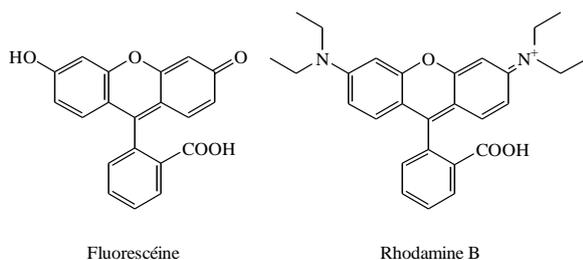


Schéma I.9 – Les luminophores organiques les plus utilisés

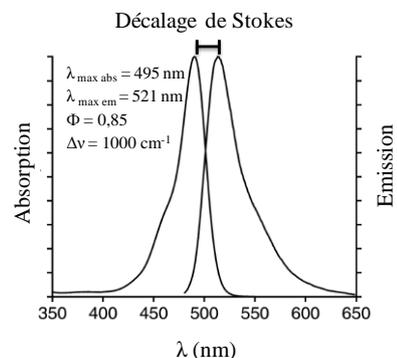


Figure I.11 – Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine – Illustration du décalage de Stokes

2.1.2.2. Les luminophores inorganiques - Complexes de métaux de transition des blocs d et f

Un complexe résulte de la coordination de ligands à un centre métallique oxydé ou non. Les complexes de métaux de transition les plus connus qui présentent des propriétés de photoluminescence sont les complexes de lanthanides Ln(III) tels que Eu(III), Tb(III), Gd(III) et les complexes de ruthénium Ru(II), bien que les complexes de Os(II)^{59,60}, Fe(II)⁶⁰, Rh(III)⁶¹, Ir(III)^{62,61} et Cu(I)⁶³ environnés de ligands chromophores, présentent eux aussi des propriétés de photoluminescence.

Les spectres d'émission des lanthanides sont caractérisés par des raies fines et intenses (Figure I.12). Les complexes de lanthanides ont de bons rendements quantiques compris entre $\Phi = 0,03-0,6^{64}$ et ont une durée de vie des états excités longue pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de ms, permettant de faire des mesures de fluorescence en temps retardé. Pour ces complexes de lanthanides, le décalage de Stokes est important, conduisant à des signaux épurés et à un gain de sensibilité.

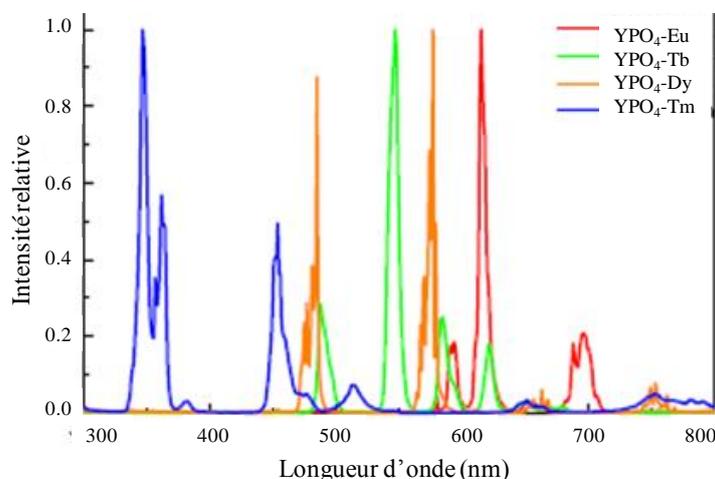


Figure I.12 – Spectres d'émission de matrices YPO₄ dopées par des ions Ln³⁺

Les propriétés de luminescence des complexes de ruthénium(II) polypyridine sont bien connues. [Ru(bpy)₃]Cl₂ (bpy = 2,2'-bipyridine) est certainement une des molécules les plus

⁵⁹ Kober, E. M.; Caspar, J. V.; Sullivan, B. P.; Meyer, T. J., *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 4587-98.

⁶⁰ Creutz, C.; Chou, M.; Netzel, T. L.; Okumura, M.; Sutin, N., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1309-19.

⁶¹ Ohsawa, Y.; Sprouse, S.; King, K. A.; DeArmond, M. K.; Hanck, K. W.; Watts, R. J., *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1047-54.

⁶² Coppo, P.; Duati, M.; Kozhevnikov, V. N.; Hofstraat, J. W.; De Cola, L., *Angew. Chem., Int. Ed* **2005**, *44*, 1806-1810.

⁶³ Cariati, E.; Bu, X.; Ford, P. C., *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3385-3391.

⁶⁴ Xiao, M.; Selvin, P. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7067-7073.

étudiées ces trente dernières années pour de nombreuses raisons. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ occupe une place particulière en raison de sa stabilité chimique, de ses propriétés électrochimiques et de ses propriétés de luminescence, ce complexe a ainsi attiré l'attention de nombreux chercheurs. En plus d'être largement utilisés pour ses propriétés de luminescence notamment pour la détection de systèmes biologiques^{53,65,66}, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ et $[\text{Ru}(\text{pp})(\text{pp}')(\text{pp}'')]\text{X}_2$, où pp, pp' et pp'' sont des ligands bidentates (bipyridine, phénanthroline) et X est un contre-ion, sont largement utilisés pour leurs propriétés d'électrochimiluminescence⁶⁷⁻⁷⁰ et trouvent des applications dans l'optoélectronique⁷¹, la conception de capteurs d'oxygène⁷²⁻⁷⁴ et de monoxyde de carbone⁷⁵ et dans le photovoltaïque.⁷⁶

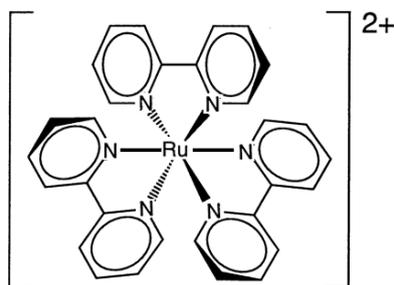


Schéma I.10 – Structure moléculaire de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est un ion complexe octaédrique et possède une symétrie D_3 (Schéma I.10). Il est composé d'un cation métallique Ru^{2+} de structure électronique $[\text{Kr}]4d^6$ et de trois ligands bipyridines qui possèdent des orbitales σ -donneurs localisées sur les atomes d'azote et des orbitales π -donneurs et π^* -accepteurs plus ou moins localisées sur les cycles aromatiques. Comme déjà mentionné, les propriétés de luminescence sont dues à une absorption d'énergie qui permet d'atteindre un état excité suivi de la restitution (totale ou partielle) d'énergie sous forme de photons vers l'état fondamental. Lorsqu'on excite un complexe métallique qui

⁶⁵ Lian, W.; Litherland, S. A.; Badrane, H.; Tan, W.; Wu, D.; Baker, H. V.; Gulig, P. A.; Lim, D. V.; Jin, S., *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 135-144.

⁶⁶ Wang, X.; Zhou, J.; Yun, W.; Xiao, S.; Chang, Z.; He, P.; Fang, Y., *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598*, 242-248.

⁶⁷ Yu, F.; Li, G.; Mao, C., *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 1244-1247.

⁶⁸ Qian, L.; Yang, X. R., *Advanced Functional Materials* **2007**, *17*, 1353-1358.

⁶⁹ Zanarini, S.; Rampazzo, E.; Della, C. L.; Marcaccio, M.; Marzocchi, E.; Montalti, M.; Paolucci, F.; Prodi, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2260-2267.

⁷⁰ Lin, Z.-j.; Chen, X.-m.; Jia, T.-t.; Wang, X.-d.; Xie, Z.-x.; Oyama, M.; Chen, X., *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 830-833.

⁷¹ Bottinelli, E.; Miletto, I.; Caputo, G.; Coluccia, S.; Gianotti, E., *J. Fluor.* **2011**, *21*, 901-909.

⁷² Zhang, H.; Li, B.; Lei, B.; Li, W., *J. Lumin.* **2008**, *128*, 1331-1338.

⁷³ Wang, S.; Li, B.; Zhang, L.; Liu, L.; Wang, Y., *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, *25*, 21-26.

⁷⁴ Wu, X.; Song, L.; Li, B.; Liu, Y., *J. Lumin.* **2010**, *130*, 374-379.

⁷⁵ Lupo, F.; Fragala, M. E.; Gupta, T.; Mamo, A.; Aureliano, A.; Bettinelli, M.; Speghini, A.; Gulino, A., *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 13459-13464.

⁷⁶ Font, J.; de, M. P.; Busque, F.; Casas, E.; Benitez, M.; Teruel, L.; Garcia, H., *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2336-2343.

présente une symétrie octaédrique, ce qui est le cas du ruthénium en première approximation, trois transitions peuvent se produire, elles sont mentionnées dans le Schéma I.11.

- La transition centrée sur le métal (TCM) correspond au passage d'un électron de l'orbitale métal π_M vers l'orbitale σ_M^* . Elle est marquée par de grandes distorsions entre l'état fondamental et l'état excité et est responsable des réactions de photodissociation ou racémisation du complexe de ruthénium.
- La transition centrée sur le ligand (TCL) correspond au passage d'un électron de l'orbitale du ligand π_L vers l'orbitale du ligand π_L^* . Elle est peu affectée par la complexation du métal et présente des caractéristiques très similaires au ligand libre.
- La transition du métal vers le ligand (TCML) correspond au passage d'un électron d'une orbitale centrée sur le métal π_M vers une orbitale centrée sur le ligand π_L^* .

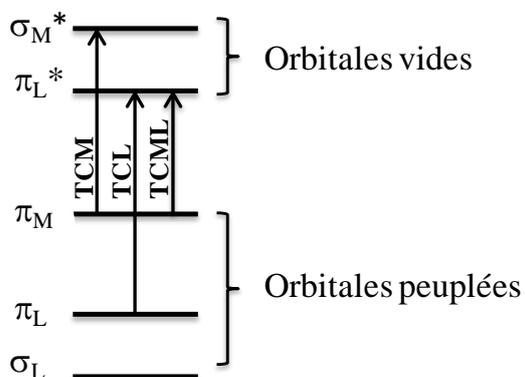


Schéma I.11 – Diagramme simplifié d'orbitales moléculaires présentant les principaux types de transitions envisageables dans les complexes de ruthénium(II) polypyridine

La luminescence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ provient de l'état triplet $^3\text{TCML}$, état excité de plus basse énergie. Le Schéma I.12 rend compte du phénomène. L'état $^1\text{TCML}$, atteint après absorption de la lumière, passe rapidement vers l'état triplet $^3\text{TCML}$ par le croisement inter-système, s'ensuit une désexcitation qui conduit à une émission dans le rouge (Figure I.13).

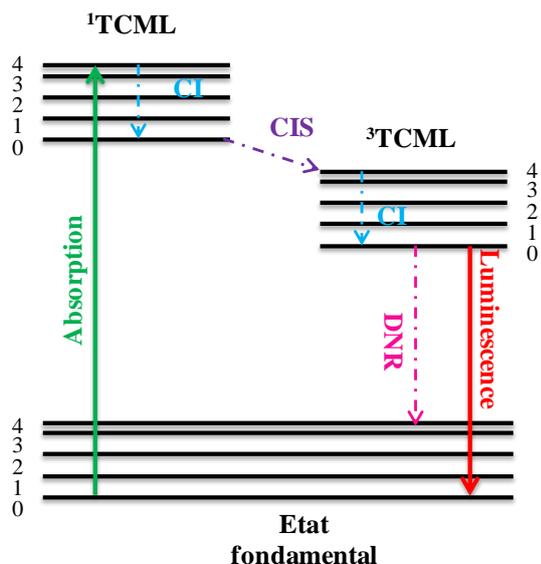


Schéma I.12 – Diagramme de Jablonski du complexe $[Ru(bpy)_3]Cl_2$. CI : Conversion Interne ; CIS : Croisement Inter-système ; DNR : Désexcitation Non Radiative

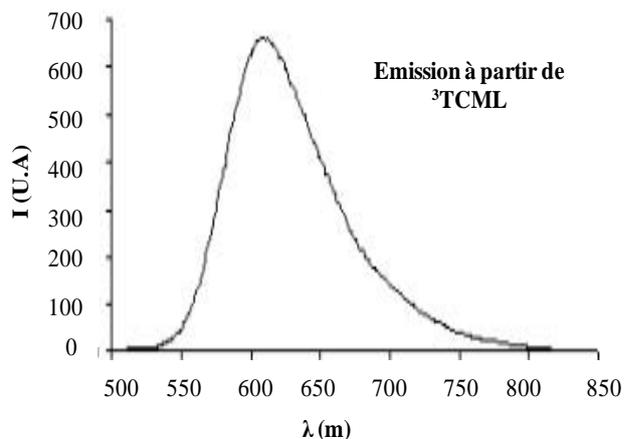


Figure I.13 – Spectre d'émission de $[Ru(bpy)_3]Cl_2$

Contrairement aux complexes de lanthanides, les complexes de ruthénium(II) ont des spectres d'émission larges et intenses (Figure I.13). Ils ont un décalage de Stokes important, des coefficients d'extinction molaire de l'ordre de $50\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, des rendements quantiques compris entre $\Phi = 0,02 - 0,4$ et des courtes durées de vie de l'état excité de quelques centaines de nanoseconde. Ainsi, les complexes de ruthénium émettent rapidement et intensément, ce qui en fait des luminophores de choix pour l'étude des milieux biologiques en instantané.

2.1.2.3. Les quantum dots

Les quantum dots sont des nanoparticules de semi-conducteurs (CdSe, CdTe/CdS...), de taille comprise entre 2-20 nm, qui présentent des propriétés de fluorescence ajustables par le contrôle de leur taille et de leur forme⁷⁷ (Figure I.14). Ces cristaux sont très brillants, offrent une grande gamme de spectres d'émission avec des bandes d'émission étroites mais surtout présentent une bonne stabilité face au photoblanchiment contrairement aux molécules organiques. Cependant ils présentent deux inconvénients, ils ont une grande toxicité vis-à-vis des entités biologiques et manifestent un phénomène de luminescence discontinue

⁷⁷ Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706-15.

(clignotement). Pour pallier les problèmes de toxicité, les quantum dots peuvent être recouverts de silice ouvrant le champ des applications biologiques *in vivo*.⁷⁸

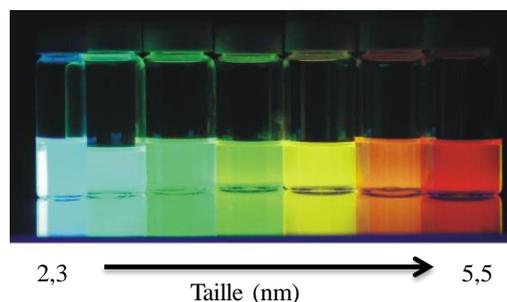


Figure I.14 – Photoluminescence des nanoparticules de CdSe de tailles différentes

2.1.2.4. Les nanoparticules d'oxydes dopés par des ions lanthanides

Les nanoparticules d'oxyde d'yttrium (Y_2O_3) et d'oxyde de gadolinium (Gd_2O_3) peuvent être dopés par des ions de lanthanides, Ln^{3+} , par réaction de substitution en raison de leurs propriétés chimiques semblables. L'espèce active obtenue présente ainsi des propriétés de luminescence. Nichkova *et al.*⁷⁹ utilisent des nanoparticules de $Gd_2O_3 : Eu$ pour la détection de l'acide 3-phenoxybenzoïque (3-BPA), qui est un métabolite issu d'un pesticide (pyréthriinoïdes).

2.1.3. Choix du luminophore

En tenant compte des caractéristiques photo-physiques des luminophores présentés ci-dessous (Tableau I.3) et de l'application que nous visons, les complexes de ruthénium tirent leur épingle du jeu.

	Luminophore organique	Complexes de lanthanides(III)	Complexes de ruthénium(II)	Quantum dots
Φ	++	-	-	++
$\Delta\nu$	-	++	+	+
τ	-	++	+	-
Photoblanchiment	-	++	++	+

Tableau I.3 – Caractéristiques photo-physiques des luminophores

Au laboratoire CIRIMAT, des travaux ont été menés par S. Cousinie^{80,81} sur la synthèse de nanoluminophores inorganiques à base de silice. De nouveaux complexes de ruthénium(II) et

⁷⁸ Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P., *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861-8871.

⁷⁹ Nichkova, M.; Dosev, D.; Gee, S. J.; Hammock, B. D.; Kennedy, I. M., *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6864-6873.

⁸⁰ Cousinie, S.; Gressier, M.; Reber, C.; Dexpert-Ghys, J.; Menu, M.-J., *Langmuir* **2008**, *24*, 6208-6214.

La réaction de Stöber est une réaction d'hydrolyse (éq.1) et de condensation comprenant deux réactions distinctes, l'alkoxolation (éq.2) et l'oxolation (éq.3) d'un alcoxysilane, généralement le TEOS en présence d'un catalyseur, l'ammoniaque.

La méthode de Stöber et la méthode par microémulsion inverse sont les deux méthodes permettant de synthétiser des nanoparticules de silice luminescentes.

2.2.1. La méthode de Stöber

La méthode de Stöber a été optimisée pour synthétiser des nanoparticules de silice luminescentes. Par cette méthode, des complexes de ruthénium(II) $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$ et $\text{Ru}(\text{Phen})_3^{2+}$ ont été encapsulés dans les nanoparticules de silice.^{67,83,84} Le luminophore organique ou inorganique est introduit directement dans le mélange TEOS/éthanol/ammoniaque. Afin de lier de façon covalente le luminophore à la matrice de silice, pour éviter sa libération, certains auteurs introduisent une fonction silane aux luminophores. Pour cela, une première étape consiste à faire réagir un luminophore contenant par exemple une fonction isocyanate avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane (Schéma I.13). Le luminophore ainsi silylé est introduit dans le mélange TEOS/éthanol/ammoniaque.⁸⁵ Notons qu'il n'y a aucun article mentionnant l'incorporation de complexe de ruthénium(II) silylé par la méthode de Stöber.

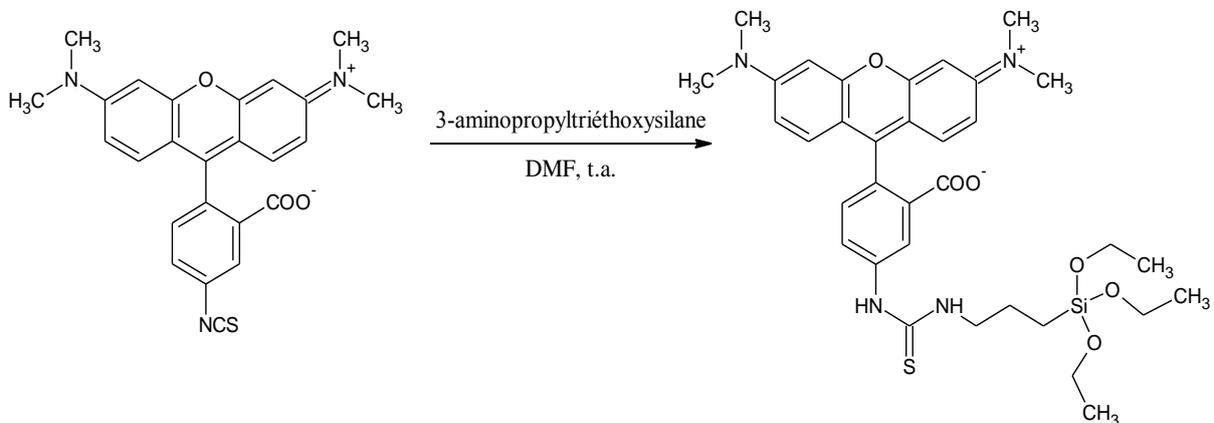


Schéma I.13 – Synthèse d'une rhodamine conjuguée au 3-aminopropyltriéthoxysilane à partir du tétraméthylrhodamine-5-isothiocyanate (Ma et al.⁸⁵)

⁸³ Rossi, L. M.; Shi, L.; Quina, F. H.; Rosenzweig, Z., *Langmuir* **2005**, *21*, 4277-4280.

⁸⁴ Zhang, D.; Wu, Z.; Xu, J.; Liang, J.; Li, J.; Yang, W., *Langmuir* **2010**, *26*, 6657-6662.

⁸⁵ Ma, D.; Kell, A. J.; Tan, S.; Jakubek, Z. J.; Simard, B., *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 15974-15981.

2.2.2. Réaction en microémulsion inverse

2.2.2.1. Généralités sur les microémulsions

La méthode de synthèse par microémulsion inverse est une méthode originale et plus récente pour préparer des nanoparticules de silice avec une dispersion en taille étroite.⁸⁶

Les microémulsions sont des dispersions colloïdales composées de deux phases non-miscibles, généralement une phase organique classiquement appelée huile et une phase aqueuse, stabilisées par un surfactant dans des proportions appropriées. Un surfactant est une molécule amphiphile, c'est-à-dire qu'elle présente deux parties de polarité différente, une tête polaire (miscible dans l'eau) et une partie hydrophobe (miscible dans le solvant organique). Il peut être anionique (AOT), cationique (CTAB) ou neutre (triton X-100, NP-5) (Schéma I.14). Cette structure permet aux surfactants de s'immiscer aux interfaces de type *huile/eau* et *eau/huile* et donc, par là même, leur donne la capacité d'abaisser l'énergie libre de ces interfaces. Ce phénomène est à la base de la stabilisation de systèmes dispersés. Grâce à la stabilisation des gouttelettes formées, les microémulsions sont thermodynamiquement stables, isotropes et transparentes.

Les surfactants présentés dans le Schéma I.14 sont les plus utilisés dans la formation de microémulsions et notamment pour la synthèse de nanoparticules de silice.

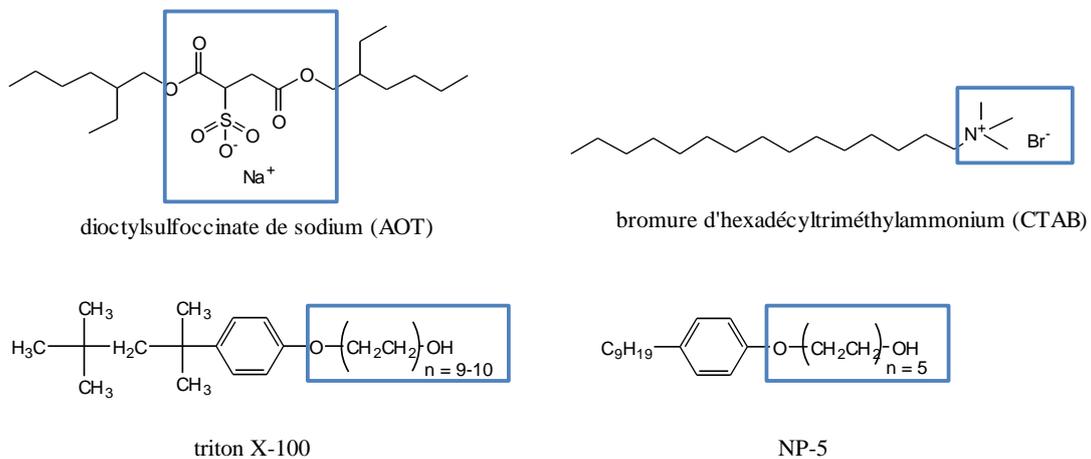


Schéma I.14 – Les surfactants les plus employés pour la formation de microémulsions

Il existe trois types de microémulsions, directe, inverse ou bicontinue, présentés dans le Schéma I.15:

- La microémulsion directe (ou encore huile dans eau) est produite quand un faible volume de solvant organique est dispersé dans la phase aqueuse. En stabilisant le

⁸⁶ Arriagada, F. J.; Osseo-Assare, K., *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *170*, 8-17.

système, le surfactant forme des micelles directes ; les têtes polaires sont dirigées vers la phase aqueuse et les queues apolaires dirigées vers l'intérieur dans lequel des composés hydrophobes peuvent être solubilisés.

- La microémulsion inverse (ou encore eau dans huile) est produite quand un faible volume d'eau est dispersé dans la phase organique. Des micelles inverses sont obtenues et sont capables de solubiliser des composés hydrophiles.
- La microémulsion bi-continue est obtenue quand des volumes quasi-identiques des deux phases non miscibles sont introduits ou quand le surfactant utilisé ne permet pas de former des gouttelettes mais des lamelles.

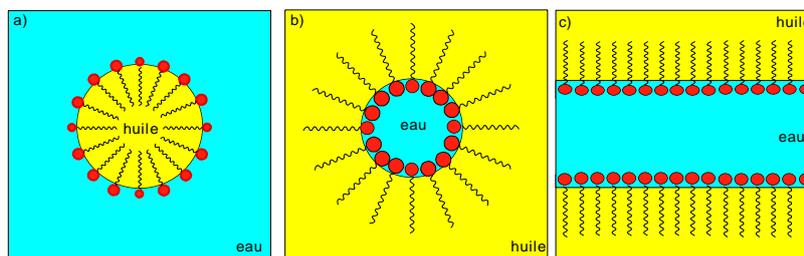


Schéma I.15 – Représentation schématique d'une microémulsion directe a), inverse b) et bicontinue c)

Quand une microémulsion inverse est formée à partir d'un système type huile/eau/surfactant, elle est dite ternaire. Il peut arriver que dans certains systèmes, le surfactant seul ne suffise pas pour réduire la tension interfaciale huile/eau et pour former une microémulsion. Dans ce cas, un alcool à moyenne chaîne est communément ajouté en tant que cosurfactant ce qui a pour effet de réduire encore la tension interfaciale, tout en augmentant la fluidité de l'interface. Le système ainsi formé huile/eau/surfactant/cosurfactant est dit quaternaire.

La microémulsion inverse offre un environnement idéal pour la synthèse des nanoparticules métalliques (Au^{87} , Ag^{88} , Fe^{89} ...) mais aussi pour les nanoparticules d'oxydes et notamment des nanoparticules de silice. De plus, elle permet l'incorporation de molécules variées.

2.2.2.2. Incorporation de complexes de ruthénium(II) par microémulsion inverse

Les nanoparticules de silice luminescentes sont obtenues par réactions d'hydrolyse et de condensation du TEOS dans la microémulsion inverse en présence du luminophore (organique ou inorganique). Ces dernières années, de nombreuses nanoparticules de silice

⁸⁷ Chen, F.; Xu, G.-Q.; Hor, T. S. A., *Mater. Lett.* **2003**, 57, 3282-3286.

⁸⁸ Bagwe, R. P.; Khilar, K. C., *Langmuir* **1999**, 16, 905-910.

⁸⁹ Li, F.; Vipulanandan, C.; Mohanty, K. K., *Colloids Surf., A* **2003**, 223, 103-112.

luminescentes ont été développées par cette méthode.^{90,91}

Alors que l'encapsulation de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est très répandue, l'incorporation de complexe de ruthénium(II) silylé par microémulsion inverse n'est pas décrit. Ce n'est que très récemment, que Song *et al.*⁹² ont décrit l'incorporation de complexe de ruthénium(II) silylé, qui n'a ni été isolé ni été caractérisé, dans les particules de silice par microémulsion inverse TX-100/cyclohexane/octanol (Figure I.16). Ils ont élaboré des particules de 51 ± 3 à 64 ± 4 nm en faisant augmenter la quantité en luminophore de 10^{-7} à 10^{-6} moles. Leur objectif était le marquage spécifique d'un parasite intestinal, *Giardia lamblia*.

Li *et al.*⁹³ ont dans un premier temps greffé un complexe de ruthénium(II) silylé à la surface de nanoparticules fer/silice, puis ils ont formé une coquille de silice, donnant lieu à un matériau doublement fonctionnalisé en son cœur (Figure I.16) ; le but étant de synthétiser un matériau multifonctionnel ayant des propriétés de magnétisme, luminescence et électrochimiluminescence. En parallèle de nos travaux, Zanarini *et al.*⁶⁹ ont synthétisé des nanoparticules de silice renfermant un complexe de ruthénium(II) silylé pour étudier l'électrochimiluminescence. De cette étude, ils montrent que l'électrochimiluminescence est meilleure quand le complexe est incorporé dans les particules que lorsque le complexe de ruthénium(II) est libre. A notre connaissance, en plus de nos travaux⁸¹, ce sont les trois seuls exemples traitant de l'incorporation de complexes de ruthénium(II) silylé dans des nanoparticules. Dans deux cas, le ligand silylé est une phénanthroline.

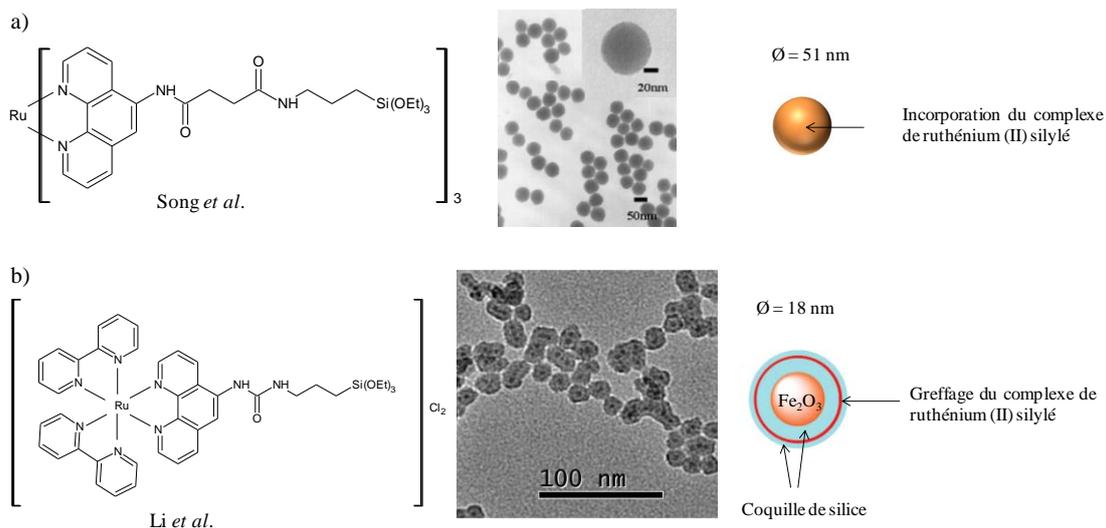


Figure I.16 – Incorporation de complexes de ruthénium(II) dans des nanoparticules de silice (Song *et al.*⁹² et Li *et al.*⁹³)

⁹⁰ Santra, S.; Wang, K.; Tapeç, R.; Tan, W., *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 160-166.

⁹¹ Qhobosheane, M.; Santra, S.; Zhang, P.; Tan, W., *Analyst* **2001**, *126*, 1274-1278.

⁹² Song, C.; Ye, Z.; Wang, G.; Jin, D.; Yuan, J.; Guan, Y.; Piper, J., *Talanta* **2009**, *79*, 103-108.

⁹³ Li, M.-J.; Chen, Z.; Yam, V. W.-W.; Zu, Y., *ACS Nano* **2008**, *2*, 905-912.

La modification de certains paramètres de la microémulsion permet de contrôler la taille des particules. Des auteurs ont reporté l'impact de plusieurs paramètres sur la taille et la dispersité des particules tels que la nature du solvant organique, du surfactant et du cosurfactant utilisé, l'addition d'électrolytes, la concentration des réactifs, le rapport [eau]/[surfactant]. Deux exemples non exhaustifs sont décrits. Bagwe *et al.*⁹⁴ ont travaillé sur la synthèse des nanoparticules de silice luminescentes par la méthode par microémulsion inverse. De nombreux critères ont été examinés comme les mesures de la fluorescence, la taille et la distribution en taille des nanoparticules de silice incorporant $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en fonction de la concentration des réactifs (TEOS, ammoniac), de la nature du surfactant, du rapport molaire eau/surfactant et du rapport molaire cosurfactant/surfactant.

Il en résulte que :

- Dans le système quaternaire triton X-100/cyclohexane/hexanol/eau, la concentration en TEOS n'a pas d'effet alors qu'une augmentation de la concentration de NH_4OH comprise entre 0,5 et 2,0 % en masse entraîne une diminution de la taille des particules de 82 à 50 nm.
- Dans le même système quaternaire, les effets des rapports eau/surfactant (R) et cosurfactant/surfactant (p) sont évalués. Lorsque R augmente de 5 à 20, la taille des particules diminue, passant de 178 à 69 nm et lorsque p augmente de 2,7 à 11, la taille des particules diminue de 97 à 72 nm.

Pour un système triton X-100/hexanol/eau/solvant organique, Yin *et al.*⁹⁵ ont étudié, en présence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, l'effet du solvant organique sur la taille des particules de silice. En utilisant six alcanes comme solvant organique, ils montrent une corrélation entre le volume molaire du solvant et la taille des particules synthétisées. Plus le volume molaire est élevé et plus les particules sont grosses. En passant du cyclohexane ($V_m = 108 \text{ mL/mol}$) à l'hexadécane ($V_m = 293 \text{ mL/mol}$) la taille des particules augmente de $53 \pm 3 \text{ nm}$ à $108 \pm 8 \text{ nm}$.

⁹⁴ Bagwe, R. P.; Yang, C.; Hilliard, L. R.; Tan, W., *Langmuir* **2004**, *20*, 8336-8342.

⁹⁵ Jin, Y.; Lohstreter, S.; Pierce, D. T.; Parisien, J.; Wu, M.; Hall, C., III; Zhao, J. X., *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4411-4419.

2.3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice

La modification chimique de la surface des nanoparticules de silice présente un grand intérêt puisqu'elle apporte de nouvelles propriétés physico-chimiques aux particules de silice. La fonctionnalisation de la silice peut se faire de différentes façons :

- Par la co-condensation d'organosilanes lors de la formation des nanoparticules de silice. Au début de la réaction, les deux précurseurs sont mélangés, par exemple le TEOS et le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). L'avantage de cette méthode est que le taux de fonctionnalisation est élevé mais l'inconvénient est que l'essentiel des groupements fonctionnels ne sont pas situés à la surface des nanoparticules de silice.
- Par des réactions de greffage en faisant réagir les groupements silanol de la surface de la silice avec des molécules capables de réagir avec eux.

Parmi les deux méthodes présentées, les réactions de greffage nous semblent plus intéressantes pour fonctionnaliser la silice. De plus, dans l'idée de coupler différentes propriétés de surface à la luminescence des nanoparticules, il nous paraît indispensable de former des liens covalents entre la silice et la molécule greffée pour éviter la libération de cette dernière.

2.3.1. Liaisons covalentes pouvant être formées avec la silice

On recense essentiellement trois sortes de liens covalents formés avec la silice.

- Formation de liaisons **Si-O-C-P** et **Si-O-C=O**

Les acides organophosphorés (phosphonique, phosphinique) et leurs esters sont des composés qui se condensent facilement sur les matrices inorganiques telles que TiO_2 , Al_2O_3 et ZnO_2 donnant lieu à des liaisons de type M-O-P. Cependant ces acides organophosphorés ne se condensent pas sur la silice. Par contre, parmi les composés phosphorés, les phosphines hydroxylés peuvent former des liaisons de type Si-O-C-P avec la silice. En 1997, Shido *et al.*⁹⁶ ont reporté la fonctionnalisation de la surface de nanoparticules de silice en utilisant une phosphine, la tris(hydroxyméthyl)phosphine, $\text{P}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ dans le but de greffer un cluster de $\text{Ir}_4(\text{CO})_{12}$ élaborant ainsi un matériau pour la catalyse supportée pour l'hydroformylation sélective des oléfines. Il est également possible de former des liaisons covalentes de type Si-O-C=O avec les carboxylates par exemple. Tian *et al.*⁹⁷ ont greffé l'acide oxalique à la surface

⁹⁶ Shido, T.; Okazaki, T.; Ichikawa, M., *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *120*, 33-45.

⁹⁷ Tian, Y.; Hua, R.; Yu, J.; Chen, B.; Sun, J.; Cheng, L., *Chinese Journal of Chemistry* **2010**, *28*, 921-927.

d'une croute de silice dans le but de coupler la protéine albumine de sérum de bovin (BSA) à la silice.

➤ Formation de liaisons **Si-O-B-R**

Un autre type de composé permettant le greffage covalent de la silice est l'utilisation d'un composé de bore BR_3 , où $R = \text{phényle}$, en présence d'une base de Brønsted (Schéma I.16).⁹⁸ La base de Brønsted permet de déprotonner le silanol ce qui rend possible l'interaction de type acide-base de Lewis entre les atomes de bore et d'oxygène en formant une liaison covalente. Sans la base, les composés de bore ne réagissent pas avec la silice mais ils sont physisorbés à la surface de la silice. Cependant cette voie présente deux inconvénients majeurs : la formation d'une entité ionique dont le contre-ion n'est pas forcément désirable et le très faible choix de fonctionnalités.

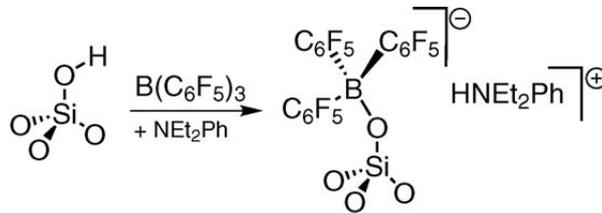
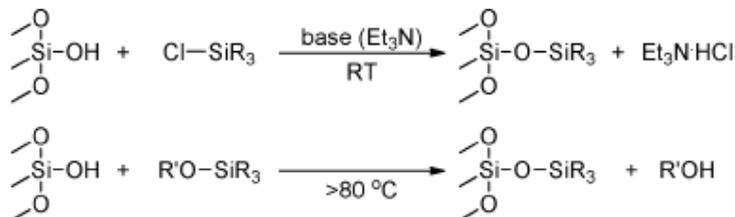


Schéma I.16 – Formation d'une liaison covalente Si-O-B (Millot et al.⁹⁸)

➤ Formation de liaisons **Si-O-Si-R**

Les organosilanes sont les molécules de choix pour la fonctionnalisation de la silice car la réaction d'un organosilane avec la silice conduit à la formation d'une liaison Si-O-Si qui est une liaison extrêmement stable vis-à-vis de l'eau et d'un grand nombre de solvants. Le greffage d'une grande variété d'organosilanes est présenté ci-dessous:

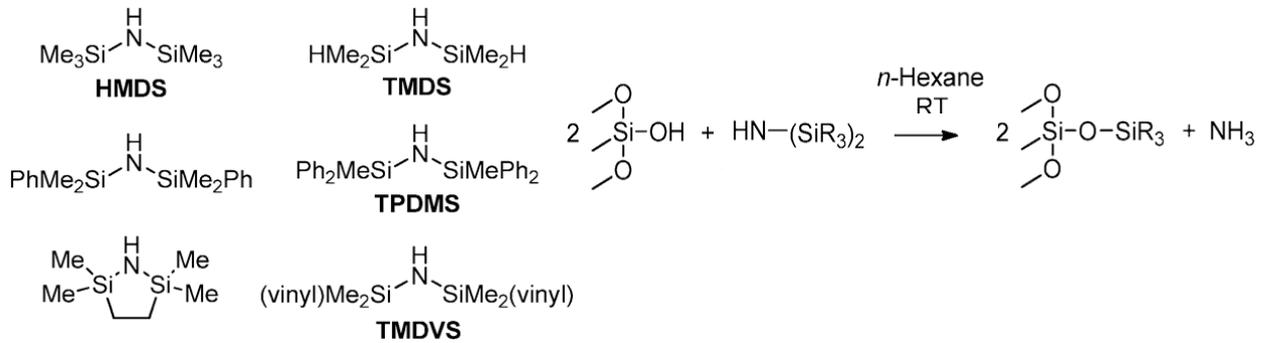
- Les organoalkoxysilanes et les organohalogénosilanes sont les organosilanes les plus très largement utilisés pour la fonctionnalisation de la silice, cependant les organochlorosilanes sont plus délicats à manipuler car ils sont très facilement hydrolysables.



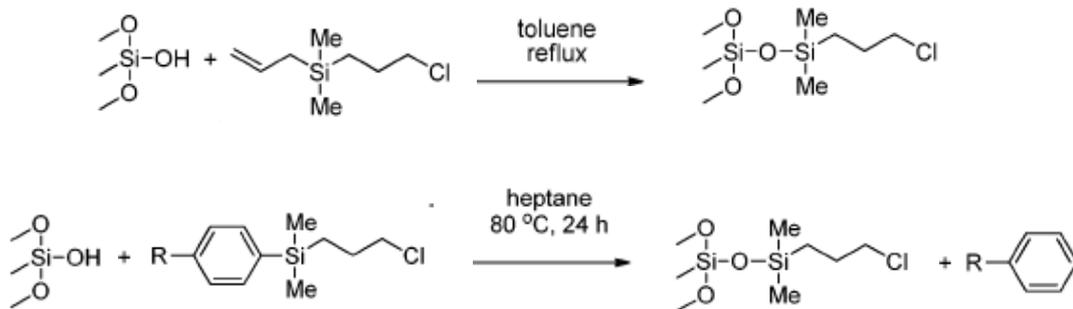
⁹⁸ Millot, N.; Santini, C. C.; Lefebvre, F.; Basset, J.-M., *C. R. Chim.* **2004**, *7*, 725-736.

Mais très récemment en 2011, Park *et al.*⁹⁹ ont reporté une alternative au greffage par des alcoxysilanes en employant d'autres composés silylés :

- Les disilazanes et les trisilazanes permettent de travailler dans des conditions plus douces.



- Les allylsilanes et les arylsilanes peuvent être greffés à la silice lors d'une réaction au reflux dans un solvant apolaire.

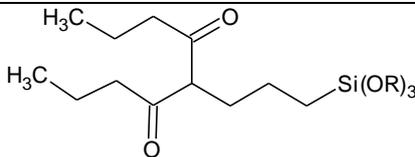
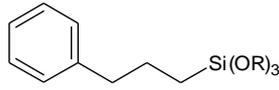
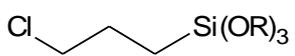
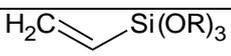
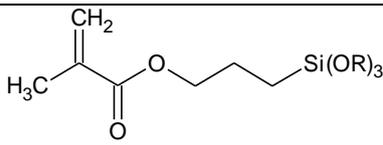
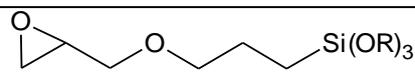
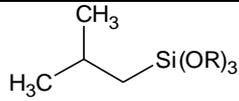
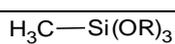
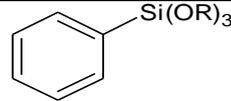
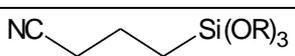


Park *et al.*⁹⁹ ont également montré que les halogénosilanes ont de meilleurs taux de greffage à la surface de la silice, suivis des allylsilanes, des arylsilanes et des alcoxysilanes. Cependant nous avons choisi de travailler avec les alcoxysilanes d'une part pour la grande diversité de groupements fonctionnels disponibles commercialement, d'autre part pour l'hydrolyse des alcoxysilanes qui est plus facile à maîtriser.

La bibliographie est riche d'exemples montrant la modification chimique de nanoparticules de silice par greffage d'organoalcoxysilanes. Ces modifications apportent au matériau de nouvelles fonctionnalités et de nouvelles propriétés physico-chimiques, élargissant les domaines d'application tant pour l'obtention de nano-composites que pour les nano-objets

⁹⁹ Park, J.-W.; Park, Y. J.; Jun, C.-H., *Chem. Commun. (Cambridge, U.K.)* **2011**, 47, 4860-4871.

biotechnologiques. Dans le Tableau I.4 ci-dessous, nous avons ciblé les alkoxy-silanes commerciaux greffés à la surface des nanoparticules de silice :

Organoalkoxysilanes	Type de particules	Domaines d'application	Références
	Aerosil® 12, 40 nm	Greffage d'organosilanes	Bauer, 2001 ¹⁰⁰
	Silice précipitée 500 nm	Nano-composites	Jesionowski 2002 ¹⁰¹
			
	Aerosil® 12, 40 nm	Charge - Amélioration de propriétés mécaniques	Bauer, 2004 ¹⁰²
			
	Aerosil® 12, 40 nm	Nano-composites	Bauer, 2005 ¹⁰³
			
			
			
	Stöber 60-100 nm	Fonctionnalisation	Berriozabal, 2010 ¹⁰⁴
	Stöber 60-100 nm	Fonctionnalisation	Berriozabal, 2010 ¹⁰⁴

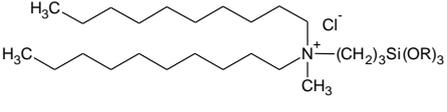
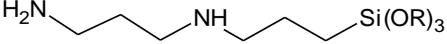
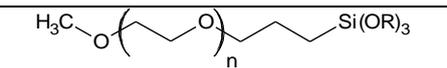
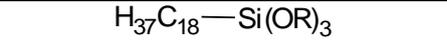
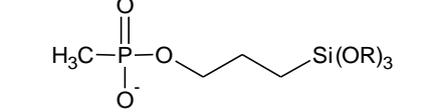
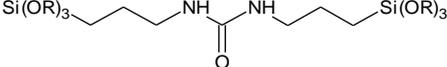
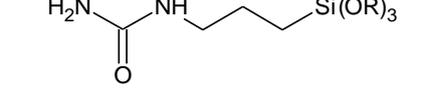
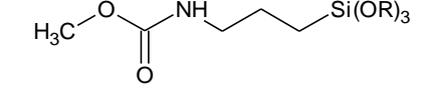
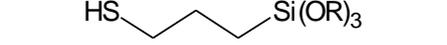
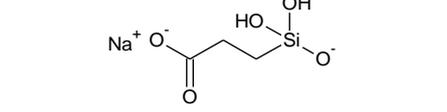
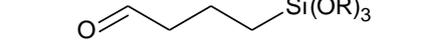
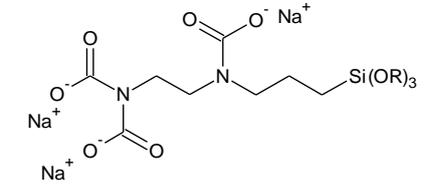
¹⁰⁰ Bauer, F.; Freyer, A.; Ernst, H.; Gläsel, H. J.; Mehnert, R., *Appl. Surf. Sci.* **2001**, 179, 118-121.

¹⁰¹ Jesionowski, T.; Krysztafkiwicz, A., *Colloids Surf. A* **2002**, 207, 49-58.

¹⁰² Bauer, F.; Ernst, H.; Hirsch, D.; Naumov, S.; Pelzing, M.; Sauerland, V.; Mehnert, R., *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, 205, 1587-1593.

¹⁰³ Bauer, F.; Mehnert, R., *J. Polym. Res.* **2005**, 12, 483-491.

¹⁰⁴ Berriozabal, G.; de Miguel, Y. R., *Phys. Status Solidi C* **2010**, 7, 2692-2696.

	Ludox® 7 nm	Nano-composites	Burlinos, 2005 ¹⁰⁵
	WO CoFe ₂ O ₄ , 10 nm	catalse	Phan, 2006 ¹⁰⁶
	WO [Ru(bpy) ₃ Cl ₂] 80-100 nm	Bio-analyse Puce ADN	Bagwe, 2006 ¹⁰⁷
			
			
			
			
	Ludox® AS40 Ludox® TMA 24 nm	Nano-hybrides	Cousinié, 2007 ¹⁰⁸
			
			
	WO Fe ₂ O ₃ 10-40 nm	Séparation de protéines	Chang, 2008 ¹⁰⁹
			
	WO [Ru(bpy) ₃ Cl ₂] 20-108 nm	Imagerie de contraste cellulaire	Jin, 2008 ⁹⁵

¹⁰⁵ Bourlinos, A. B.; Herrera, R.; Chalkias, N.; Jiang, D. D.; Zhang, Q.; Archer, L. A.; Giannelis, E. P., *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 234-237.

¹⁰⁶ Phan, N. T. S.; Jones, C. W., *J. Mol. Catal. A : Chem.* **2006**, *253*, 123-131.

¹⁰⁷ Bagwe, R. P.; Hilliard, L. R.; Tan, W., *Langmuir* **2006**, *22*, 4357-4362.

¹⁰⁸ Cousinie, S.; Gressier, M.; Alphonse, P.; Menu, M.-J., *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 6492-6503.

¹⁰⁹ Chang, J. H.; Kang, K. H.; Choi, J.; Jeong, Y. K., *Superlattices Microstruct.* **2008**, *44*, 442-448.

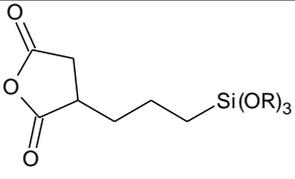
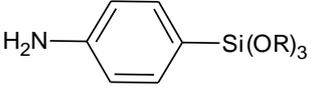
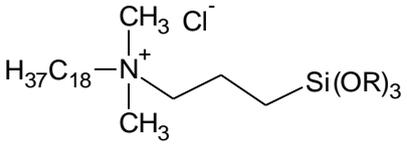
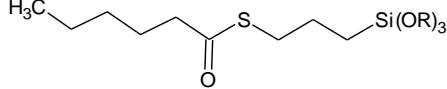
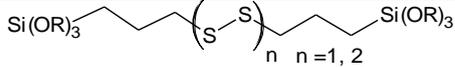
	Stöber 50 nm	Nano-composites	Lim, 2011 ¹¹⁰
			
	Silice colloïdale 10 nm	Biotechnologie	Song, 2011 ¹¹¹
	Cab-o-sil® 10 nm	Charge – Renforcement de propriétés mécaniques	Mora- Barrantes, 2011 ¹¹²
			

Tableau I.4 – Organoalkoxysilanes greffés à la surface de nanoparticules de silice

Une grande variété de fonctions peuvent être greffées à la surface des nanoparticules menant à des applications variées. Parmi ces différentes fonctionnalisations, très récemment un organosilane d'intérêt accru pour notre étude, a été greffé à la surface des nanoparticules de silice. Cet organosilane, est un ammonium quaternaire, présentant des propriétés antimicrobiennes.¹¹¹

2.3.2. Conditions de fonctionnalisation

La réaction des organoalkoxysilanes sur la silice a largement été étudiée aussi bien en milieu aqueux qu'en milieu organique.

2.3.2.1. En milieu aqueux

En présence d'eau, la première réaction qui a lieu est l'hydrolyse des groupements alkoxyde du silane, mais dans le cas des organoalkoxysilanes, elle est relativement lente. Avant même que l'hydrolyse de l'alkoxysilane soit complète, la condensation prend place, faisant intervenir des réactions d'oligomérisation (Schéma I.17). Ces oligomères se greffent à la surface des nanoparticules de silice, ce qui conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel

¹¹⁰ Lim, A. Y.; Gu, F.; Ma, Z.; Ma, J.; Rowell, F., *Analyst* **2011**, 136, 2775-2785.

¹¹¹ Song, J.; Kong, H.; Jang, J., *Colloids Surf. B* **2011**, 82, 651-656.

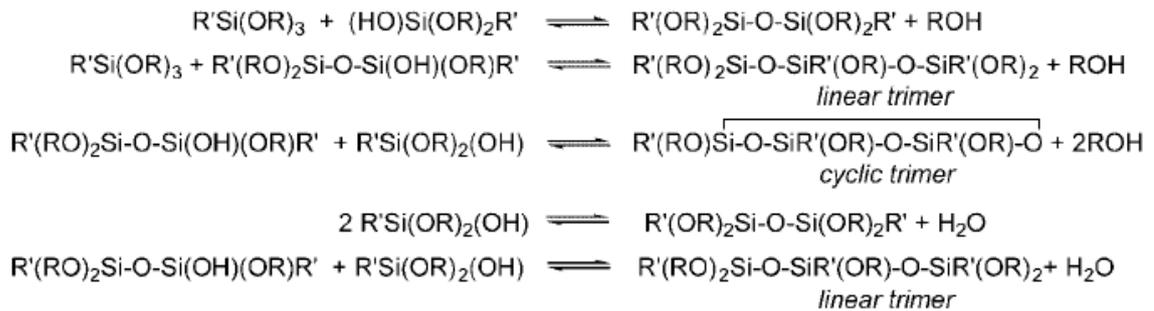
¹¹² Mora-Barrantes, I.; Rodriguez, A.; Ibarra, L.; Gonzalez, L.; Valentin, J. L., *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 7381-7392.

non structuré et peu reproductible (Schéma I.18a). Cependant, il est possible d'obtenir un recouvrement en monocouche (Schéma I.18b) si les cinétiques d'hydrolyse et de condensation sont contrôlées, par exemple en ajoutant une quantité variable de solvant organique tel que l'éthanol ou l'acétone.^{108,113}

(i) Hydrolysis



(ii) Oligomerization reactions



(iii) Grafting reaction on silica surface

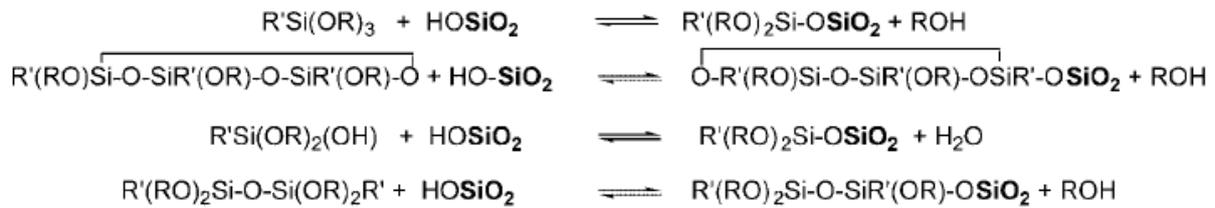


Schéma I.17 – Réactions ayant lieu en milieu aqueux et à la surface des nanoparticules de silice (Cousinié et al.¹⁰⁸)

2.3.2.2. En milieu organique

L'obtention d'un réseau tridimensionnel peut être évitée par un choix approprié des conditions expérimentales. Quand la réaction de greffage a lieu dans un solvant organique anhydre, la réaction d'hydrolyse est ralentie et contrôlée. En milieu anhydre, l'organosilane se condense sur les silanols en surface de la silice, permettant la formation de monocouches à la surface de la silice. En 1999, Sutra *et al.*¹¹⁴ montrent qu'en travaillant en milieu anhydre le mécanisme diffère de celui observé en milieu aqueux et que le greffage se fait par la substitution nucléophile sur le silicium de l'organosilane. Des greffages d'organosilane en monocouche (Schéma I.18b) ont été réalisés dans ces conditions par Snidorf *et al.*¹¹⁵ Une autre façon de procéder pour l'obtention de monocouche à la surface des nanoparticules de

¹¹³ Park, Y. S.; Ito, Y.; Imanishi, Y., *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2755-2758.

¹¹⁴ Sutra, P.; Fajula, F.; Brunel, D.; Lentz, P.; Daelen, G.; Nagy, J. B., *Colloids Surf., A* **1999**, *158*, 21-27.

¹¹⁵ Snidorf, D. W.; Maciel, G. E., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3767-3776.

silice est de travailler avec des monoalkoxysilanes. La présence d'un groupement alkoxyde hydrolysable, au lieu de trois dans le cas des trialkoxysilanes, ne permet pas la formation d'oligomères à la surface des nanoparticules de silice.

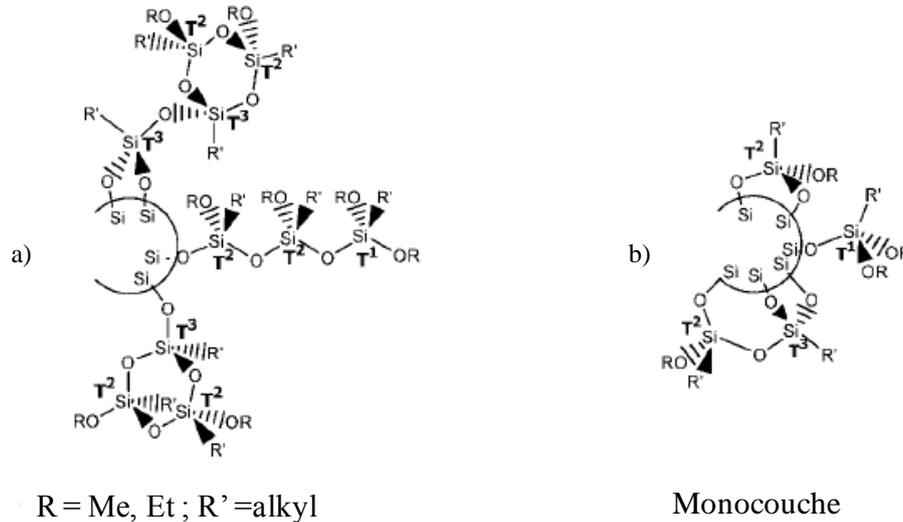


Schéma 1.18 – a) Représentation schématique du greffage d'oligomères ; b) du greffage d'une monocouche d'organosilanes (Cousinié *et al.*¹⁰⁸)

Le solvant joue un rôle très important dans la réaction de greffage. Sa constante électrique et son encombrement stérique influencent les réactions d'hydrolyse-condensation de l'organosilane et la solubilité des espèces hydrolysées ainsi que la réactivité des organosilanes. Récemment, Rahman *et al.*¹¹⁶ ont réalisé le greffage du 3-aminopropyltriéthoxysilane en milieu organique polaire et apolaire en utilisant respectivement de l'éthanol et du toluène anhydres. Ils ont montré que le taux de greffage en présence du toluène était supérieur à celui obtenu dans l'éthanol. Ceci s'explique par le fait que les solvants polaires protiques, cas de l'éthanol, interagissent avec la silice par des liaisons hydrogènes. Ces interactions avec la silice réduisent la surface accessible aux organosilanes.

La réaction de greffage dépend du solvant employé, de la température et du temps de la réaction. Pour s'assurer du greffage, Vansant *et al.*¹¹⁷ proposent de réaliser un post-traitement thermique entre 80 °C et 200 °C dans le but d'accélérer la condensation des organosilanes qui pourraient être physisorbées et chimisorbées à la surface des nanoparticules de silice.

¹¹⁶ Rahman, I.; Jafarzadeh, M.; Sipaut, C., *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2011**, 59, 63-72.

¹¹⁷ Vansant, E. F.; Van Der Voort, P.; Vrancken, K. C., *Studies in surface science and catalysis* Ed. **1995**, vol 93 - Characterization and chemical modification of the silica surface.

2.4. Caractérisation des nanoparticules de silice fonctionnalisées

Au vu du nombre de publications parues sur les nanoparticules de silice chimiquement modifiées ces dernières années, il s'avère que la caractérisation de particules reste légère malgré les techniques disponibles de plus en plus nombreuses et performantes. Dans ces travaux de thèse nous avons donc mis l'accent sur la caractérisation physico-chimique des nanoparticules bifonctionnelles.

- Morphologie et taille des nanoparticules :

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir des images de la surface d'objets en 3 dimensions à très haute résolution, de l'ordre du nanomètre. Alors que la microscopie électronique à transmission permet de réaliser des images en 2 dimensions à très haute résolution, elle possède l'avantage d'évaluer avec précision la taille des nanoparticules (Figure I.17).

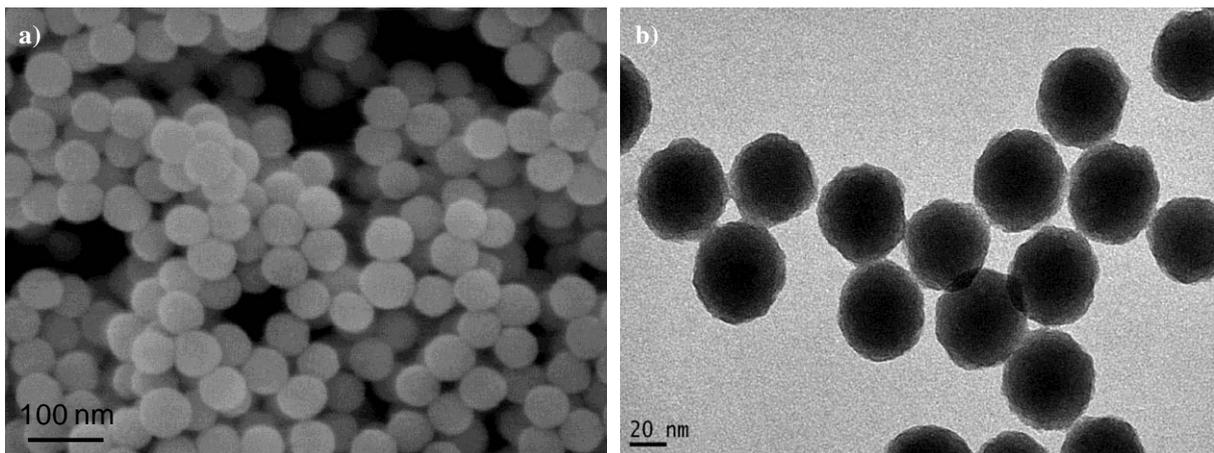


Figure I.17 – a) Clichés MEB et b) MET de nanoparticules de silice (Cousinié et al.⁸¹)

En solution, le comportement des nanoparticules est évalué par l'analyse de diffusion de la lumière (DLS), elle permet de connaître le diamètre hydrodynamique et informe sur la dispersion de taille des nanoparticules. Le diamètre hydrodynamique qui tient compte de la couche de solvation des colloïdes en solution est supérieur à la taille de particules déterminée par microscopie.

- Caractérisations physico-chimiques :

La RMN à l'état solide est une spectroscopie très utile pour la caractérisation des nanoparticules de silice. Lorsque l'on sonde le ^{29}Si , elle donne des informations précieuses concernant l'environnement des atomes de silicium dans le matériau. Une terminologie spéciale y est dédiée; la lettre Q est attribuée aux atomes de silicium qui sont entourés de quatre atomes d'oxygène et l'exposant réfère aux nombres de liaisons siloxanes (Si-O-Si). Le silicium présent dans la matrice de silice est donc désigné Q^4 et donne un signal à -110 ppm. A la surface de la silice, les différentes formes des groupements silanols sont représentées dans le Schéma I.19. Sindorf et Maciel^{118,119} ont permis d'attribuer les signaux qui apparaissent à -100 ppm aux silanols Q^3 (isolés et vicinaux) et les signaux qui apparaissent à -94 ppm aux silanols géminaux Q^2 .

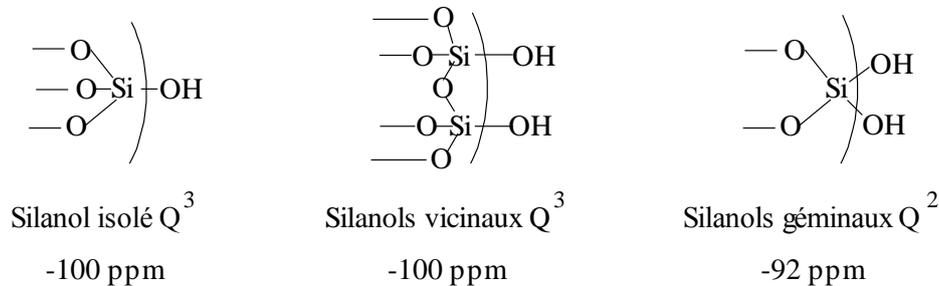


Schéma I.19 – Différents types de silanols rencontrés à la surface de la silice

Quand les nanoparticules de silice sont modifiées chimiquement par des organoalkoxysilanes, les signaux montrant la formation de liaisons covalentes entre la silice et les organosilanes sont facilement repérables. L'atome de silicium de l'organoalkoxysilane est désigné par la lettre M, D ou T selon le nombre de groupements alkoxydes qui l'entourent. Le Schéma I.20 représente des exemples d'organoalkoxysilanes ayant respectivement 1, 2 ou 3 groupements alkoxydes et les différentes possibilités de se greffer à la surface de la silice ainsi que l'évolution des déplacements chimiques (δ).

¹¹⁸ Sindorf, D. W.; Maciel, G. E., *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 5516-5521.

¹¹⁹ Maciel, G. E.; Sindorf, D. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7606-7.

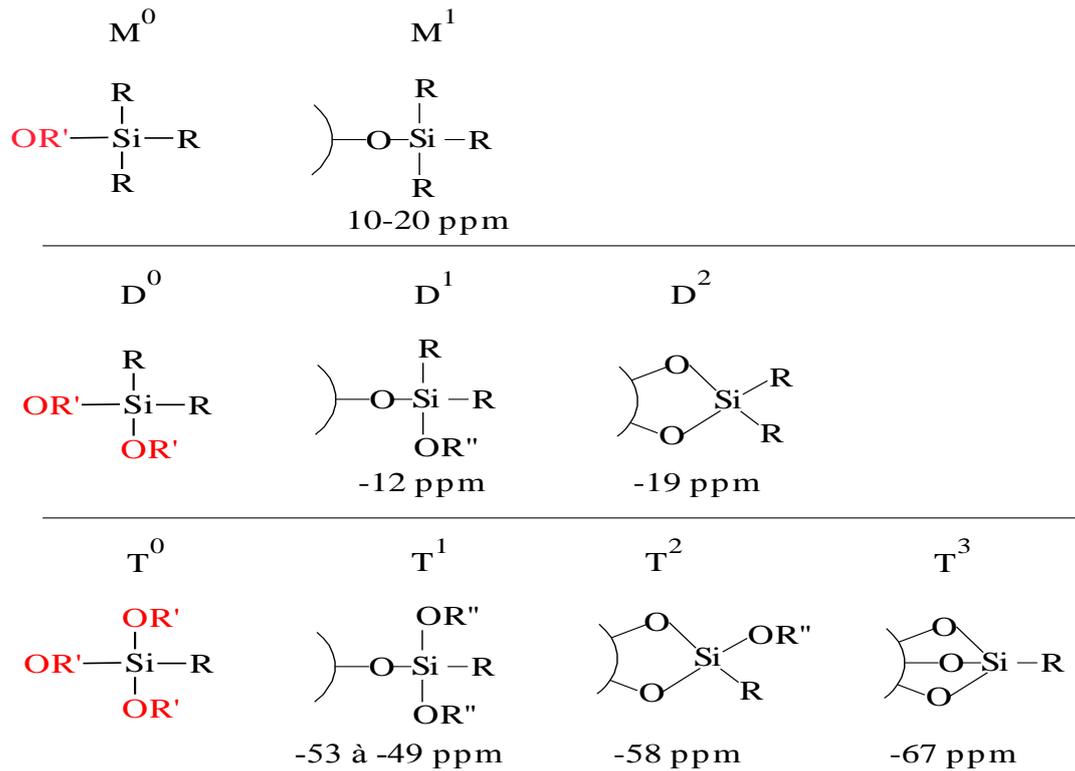


Schéma I.20 – Nomenclature des atomes de Si et déplacements chimiques en RMN ^{29}Si (δ) – Différentes manières dont les organoalkoxysilanes peuvent se greffer ($R = \text{alkyl}$, $R' = \text{alkyl}$ et $R'' = \text{H}$ ou alkyl)

La spectroscopie infrarouge (DRIFT) et la RMN CP MAS du ^{13}C sont les deux spectroscopies les plus employées pour vérifier l'intégrité chimique des groupements greffés.^{120,121} De plus, la spectroscopie RMN CP MAS du ^{13}C permet également de nous rendre compte de la présence de solvants à la surface des nanoparticules et de savoir si tous les groupements alkoxyde sont hydrolysés puisque lorsque l'hydrolyse est complète, les signaux des groupements alkoxydes disparaissent.

La spectroscopie de photoélectrons de rayon X (XPS) permet d'analyser la composition chimique **de l'extrême surface** et de connaître les états d'oxydation de l'élément étudié. De plus, elle permet également de consolider les attributions des signaux faites en IR, sachant qu'en IR des groupements chimiques de nature complètement différente peuvent absorber aux mêmes nombre d'ondes. Jedlicka *et al.*¹²² ont caractérisé un gel de silice modifié par différents peptides par spectroscopie de photoélectrons de rayon X. Ils parviennent à distinguer les différents peptides, à calculer le taux de greffage et à remonter avec précision à

¹²⁰ McKenzie, M.T.; Culler, S.R.; Koenig, J.L., *Appl. Spectrosc.* **1984**, *38*, 786-790.

¹²¹ Bayer, E.; Albert, K.; Reiners, J.; Nieder, M.; Müller, D., *J. Chromatogr. A* **1983**, *264*, 197-213.

¹²² Jedlicka, S. S.; Rickus, J. L.; Zemlyanov, D. Y., *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11850-11857.

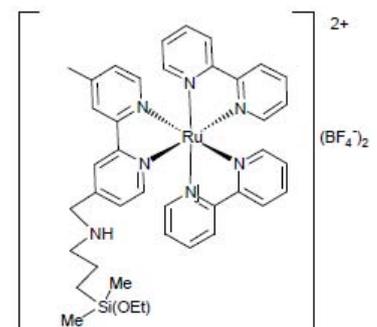
l'épaisseur du revêtement formé. L'épaisseur du recouvrement est de l'ordre de 1-3 nm, déduite de l'intensité des pics de carbone C 1s ou N 1s.

Le potentiel zêta est un paramètre physico-chimique informant sur la stabilité des particules en solution. Le potentiel zêta ξ d'une particule est la charge totale surfacique que la particule acquiert dans un solvant. La mesure de ξ est une indication de la force de répulsion entre les particules et elle peut être utilisée pour prédire la stabilité d'une solution colloïdale de particules sur du long-terme. Si les particules en suspension ont un potentiel zêta élevé, elles se repoussent entre elles et n'ont pas tendance à s'agglomérer. Bagwe *et al.*¹⁰⁷ ont montré que l'introduction de groupements phosphonate dans des particules fonctionnalisées par des groupements amine diminuait le potentiel zêta passant de 0 à -35 mV obtenant ainsi des particules stables en solution, contrairement aux nanoparticules fonctionnalisées uniquement par des groupements amine.

3. Voies retenues dans ces travaux de thèse

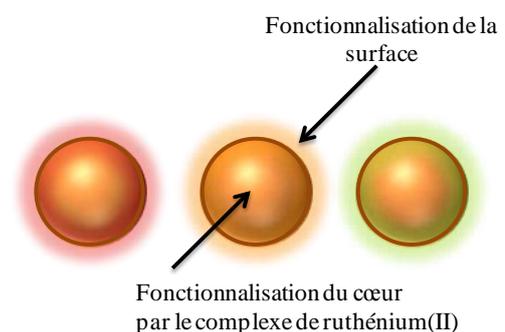
L'objectif de cette thèse étant d'élaborer des nano-sondes à base de silice pour l'exploration de biofilms bactériens *in situ*, nous avons opté pour la synthèse de nanoparticules bifonctionnelles, fonctionnalisées à cœur et en surface pour apporter différentes propriétés de surface.

Parmi les luminophores existants, nous avons fait le choix de travailler avec le complexe de ruthénium(II) silylé. Les travaux de S. Cousinié nous ont amenés à synthétiser un complexe de ruthénium(II), homologue de **C1**. Nous avons mis en évidence dans cette étude bibliographique que l'incorporation de complexe de ruthénium silylé était plus adaptée par la réaction par microémulsion, voie que nous avons retenue.



Complexe **C1**

Par la suite, nous avons choisi les organoalkoxysilanes, qui sont des molécules de choix pour la fonctionnalisation des nanoparticules de silice, pour apporter différentes propriétés de surface (hydrophile cationique ou anionique,



hydrophobe). La réaction de greffage en milieu anhydre permettant d'obtenir des recouvrements en monocouche a été retenue pour la modification chimique de la surface des nanoparticules.

Le choix de ces organoalkoxysilanes a été guidé par la nature physico-chimique de l'EPS du biofilm que nous avons choisi d'étudier. Chez *P. aeruginosa*, l'EPS est globalement chargé négativement de par la forte présence de groupements carboxylates provenant des acides humiques. En fonction de ces considérations, nous avons choisi de greffer des organosilanes portant différents groupements fonctionnels, dont les formules développées sont illustrées dans le Schéma I.21. Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (**A**), le N-(triméthoxysilylpropyl)éthylènediamine triacétate de sodium (**B**), le chlorure de triméthyl (3-triméthoxysilylpropyl)ammonium (**C**), le chlorure d'octadecyldiméthyl (3-triméthoxysilylpropyl) ammonium (**D**), l'hexaméthylidisilazane (**E**) et l'octyltriéthoxysilane (**F**) ont été choisis.

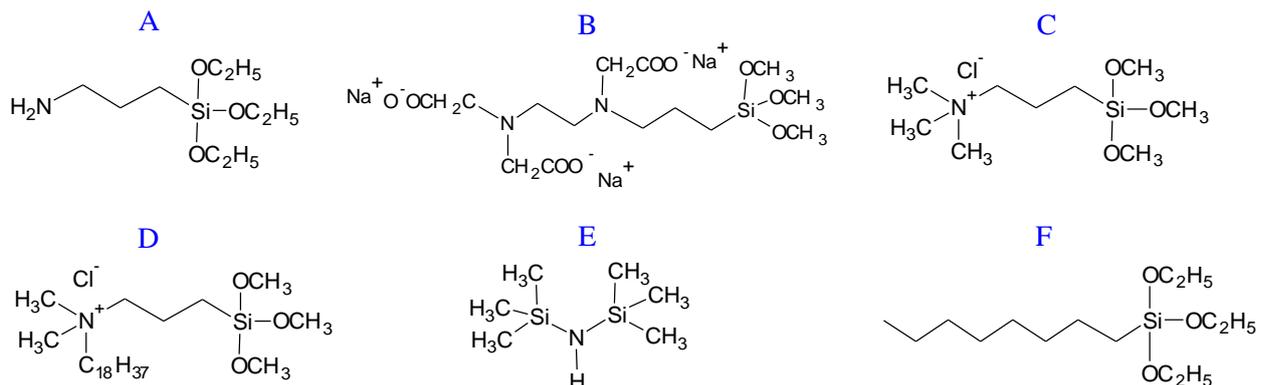


Schéma I.21 – Formules développées des organosilanes utilisés pour le greffage des nanoparticules

La fonctionnalisation de particules lumineuses par les groupements amino- et carboxylato- est idéale pour réaliser des réactions de bio-conjugaison avec des protéines et de l'ADN par le biais de liaisons peptidiques mais aussi pour le marquage cellulaire.^{123,124,125} De plus, les études sur la diffusion dans les biofilms des billes de latex modifiées par des groupements carboxylate et amine, nous poussent à choisir ces groupements fonctionnels classiques pour notre étude.⁴⁴

¹²³ Shi, B.; Wang, Y.; Guo, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Guo, Y.; Zhang, Z.; Liu, X.; Lu, G., *Catal. Today* **2009**, *148*, 184-188.

¹²⁴ Wang, L.; Yang, C.; Tan, W., *Nano Lett.* **2004**, *5*, 37-43.

¹²⁵ Senarath-Yapa, M. D.; Phimphivong, S.; Coym, J. W.; Wirth, M. J.; Aspinwall, C. A.; Saavedra, S. S., *Langmuir* **2007**, *23*, 12624-12633.

Pour apporter de l'originalité, nous avons greffé différents ammoniums quaternaires, à partir des organosilanes **C** et **D**, sachant que la molécule **D** est connue pour ses propriétés antibactériennes. Ainsi, nous évaluerons la pénétration d'un antibactérien greffé à la surface des nanoparticules, au sein du biofilm.

L'étude bibliographique a montré que les biofilms à *P. aeruginosa* comportaient des zones hydrophobes.³¹ Nous avons donc choisi de greffer des groupements hydrophobes, groupements octyle et méthyle apportés par les organosilanes **E** et **F**. De plus ces deux groupements méthyle et octyle amènent une hydrophobicité différente de par la longueur de leur chaîne.

Grâce aux nanoparticules de silice bifonctionnelles couplées à la technique de microscopie confocale, il nous sera possible d'explorer le biofilm modèle *in situ* et de se rendre compte des interactions physicochimiques existantes entre les fonctions que nous avons choisies et la matrice du biofilm modèle.

Chapitre II

Partie expérimentale

A- Synthèse et Caractérisations des nanoparticules de silice bifonctionnelles....	58
1. Origine des réactifs de synthèse.....	58
1.1. Les solvants.....	58
1.2. Les Précurseurs.....	58
1.2.1. Ligand.....	58
1.2.2. Complexes.....	59
1.2.3. Nanoparticules de silice.....	59
1.2.4. Greffage des nanoparticules de silice.....	60
2. Techniques de caractérisation.....	60
2.1. Analyse élémentaire.....	60
2.2. Résonance Magnétique Nucléaire.....	60
2.2.1. La RMN en solution.....	60
2.2.2. La RMN CP-MAS.....	61
2.2.2.1. Cross Polarization(CP).....	61
2.2.2.2. Magic Angle Spinning (MAS).....	61
2.3. Spectroscopie Infra-rouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	62
2.3.1. Analyse en transmission.....	62
2.3.2. Analyse par réflexion diffuse.....	62
2.4. Spectroscopie UV-visible.....	62
2.5. Spectroscopie de masse.....	62
2.6. Spectroscopie de Photo-électrons en Rayon X.....	63
2.7. Potentiel zêta.....	63
2.8. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	63
2.9. Evaluation de la balance hydrophile/hydrophobe.....	63
2.9.1. Mesures de l'angle de contact.....	63
2.9.2. Mesures du coefficient de partage (P) et LogP.....	64
2.10. Microscopies électroniques.....	64
2.10.1. Microscopie à balayage (MEB-FEG).....	64
2.10.2. Microscopie à transmission (MET).....	64
2.11. Mesures de la taille des nanoparticules.....	65
2.11.1. Mesure par diffusion de la lumière (DLS).....	65
2.11.2. Mesures statistiques en microscopie électronique à transmission.....	65
2.12. Photoluminescence (PL).....	65
3. Synthèse et Caractérisations du ligand et des complexes de Ruthénium.....	65
3.1. Formation du 4-aldéhyde-4'-méthylbipyridine : 1 ¹⁰⁸	65
3.2. Formation du 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl)iminométhyl-2,2'-bipyridine : 2 ¹⁰⁸	66
3.3. Formation du ligand 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl) aminométhyl-2,2'-bipyridine : (bpy-Si) ¹⁰⁸	67
3.4. Synthèse des complexes de Ruthénium.....	67
3.4.1. Synthèse de [Ru(bpy) ₂ (bpy-Si)]Cl ₂ ⁸¹	67
3.4.2. Synthèse de RuCl ₂ (bpy-Si) ₂ ⁸¹	68
4. Synthèse des nanoparticules de silice bifonctionnelles.....	69
4.1. Microémulsion inverse.....	69
4.1.1. Système quaternaire.....	69
4.1.2. Système ternaire.....	71

4.2. Fonctionnalisation en surface par réaction de greffage des organosilanes	71
B- Elaboration des biofilms <i>P. aeruginosa</i>	74
1. Matériels	74
2. Souche utilisée.....	75
3. Conservation, entretien et identification de la souche	75
4. Milieux de culture.....	75
5. Elaboration des biofilms à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
C- Exploration des biofilms avec des nanoparticules de silice bifonctionnelles .	76
1. Préparation des suspensions de nanoparticules	76
2. Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules de silice luminescentes sur le biofilm par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC)	77
3. Observation en microscopie confocale.....	77
3.1. Marquage des bactéries	79
3.2. Marquage de l'EPS	80
3.3. Acquisition des images en microscopie confocale	80
3.4. Traitements des images	81

A- Synthèse et Caractérisations des nanoparticules de silice bifonctionnelles

1. Origine des réactifs de synthèse

1.1. Les solvants

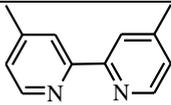
Les solvants utilisés pour la synthèse des composés chimiques à l'exception du 1,4-dioxane sont distillés et conservés sous azote. Les solvants utilisés sont des solvants pour analyses. Le dichlorométhane, le chloroforme et l'éther proviennent de SDS Carlo Erba. L'éthanol absolu et le 1,4-dioxane proviennent de VWR Prolabo.

La distillation du dichlorométhane, du chloroforme et de l'éther est réalisée en présence de chlorure de calcium (CaCl_2) puis ces produits sont stockés sur tamis moléculaire de 4 Å et sous azote.

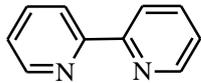
La distillation de l'éthanol est faite en 2 étapes. Dans un premier temps un agent desséchant est appliqué pour éliminer l'eau présente dans l'éthanol puis la distillation se fait en présence d'hydrure de calcium (CaH_2). L'éthanol est stocké sur tamis moléculaire de 3Å et sous azote.

1.2. Les Précurseurs

1.2.1. Ligand

Nom	Formule	Fournisseur	Pureté (%)	Masse (g.mol^{-1})
4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine		Fluka	pur	184,24
Dioxyde de Sélénium	SeO_2	Acros	99,8	110,95
Carbonate de Sodium	Na_2CO_3	VWR Prolabo	pur	105,98
Sulfite de Sodium	Na_2SO_3	Prolabo	pur	126,04
Sulfate de Sodium anhydre	Na_2SO_4	VWR Prolabo	pur	142,04
3-aminopropyl triéthoxysilane	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OEt})_3$	Acros	99,9	221,37
Borohydrure de Sodium	NaBH_4	Acros	99	37,83

1.2.2. Complexes

Nom	Formule	Fournisseur	Pureté (%)	Masse (g.mol ⁻¹)
Chlorure de Ruthénium	RuCl ₃ .xH ₂ O	Acros	35-40% de Ru	207,42
Bipyridine		Acros	>99	156,19
Chlorure de Lithium	LiCl	Acros	99	42,39

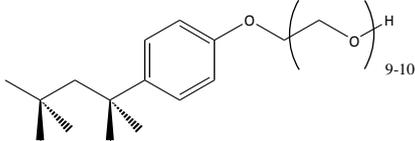
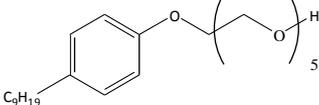
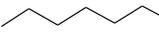
Le complexe de RuCl₂(bpy)₂.2H₂O est obtenu d'après le protocole mis au point par B.P. Sullivan¹²⁶ en mettant en jeu RuCl₃.xH₂O. Une poudre noire cristalline est obtenue avec un rendement de 67%.

Le complexe de [Ru(bpy)₃]Cl₂.6H₂O est obtenu d'après le protocole mis au point par G.F. Strouse.¹²⁷ Une poudre orange est obtenue avec un rendement de 82%.

Le complexe de RuCl₂(DMSO)₄ est obtenu d'après le protocole de I.P. Evans.¹²⁸ Une poudre jaune est obtenue avec un rendement de 66%.

1.2.3. Nanoparticules de silice

Les produits sont utilisés sans purification.

Nom	Formule	Fournisseur	Pureté (%)	Masse (g.mol ⁻¹)
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	SDS	pur	84,16
Triton X-100		Acros	pur	646,85
Igepal CO 520		Aldrich	pur	~ 441
n-Hexanol		Acros	98	102,18
Ammoniaque	NH ₄ OH	VWR Prolabo	28 wt%	35,04
Tétraéthoxyorthosilicate	Si(OEt) ₄	Acros	98	208,33

¹²⁶ Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Meyer, T. J., *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 3334-41.

¹²⁷ Strouse, G. F.; Schoonover, J. R.; Duesing, R.; Boyde, S.; Jones, W. E., Jr.; Meyer, T. J., *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 473-487.

¹²⁸ Evans, I. P.; Spencer, A.; Wilkinson, G., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1973**, 204-9.

1.2.4. Greffage des nanoparticules de silice

Les organosilanes sont utilisés sans purification.

Nom	Formule	Origine	Pureté (%)	d (g.cm ⁻³)	Masse (g.mol ⁻¹)	Désignation
3-aminopropyl triéthoxysilane		ACROS	99,9	0,942	221,37	A
N-(3-triméthoxysilylpropyl) ethylenediamine triacétate de sodium		ABCR	50% dans H ₂ O	1,26	462,42	B
Chlorure de N-(3-triméthoxysilylpropyl) N,N,N triméthylammonium		ABCR	50% dans MeOH	0,927	257,83	C
Chlorure d'octadecyldiméthyl N-(3-triméthoxysilylpropyl) ammonium		ABCR	60% dans MeOH	0,89	496,28	D
Hexaméthylidisilazane		ACROS	>98	0,76	161,39	E
Octyltriéthoxysilane		ABCR	97	0,88	276,46	F

2. Techniques de caractérisation

2.1. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont été faites au Laboratoire de Chimie de Coordination à Toulouse sur un analyseur PERKIN ELMER 2400 série II. Les éléments dosés sont C, H, N avec une erreur relative de 0,5%. Des analyses élémentaires ont également été réalisées au Service Central d'Analyse à Solaize sur un analyseur élémentaire CHN avec une limite de détection de 0,40% pour le carbone, de 0,30% pour l'azote et l'hydrogène.

2.2. Résonance Magnétique Nucléaire

2.2.1. La RMN en solution

Les spectres de RMN des noyaux ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un Bruker 300 Ultrashield®, Avance 300 MHz équipé d'une sonde BBFO ATMA, au Service Commun de RMN de l'Université Paul Sabatier. La fréquence résonante des noyaux est respectivement de 300,13 MHz et de 75,47 MHz.

Les déplacements chimiques, exprimés en ppm, sont comptés positivement vers les champs faibles, et sont donnés par rapport aux solvants deutérés permettant de caler les déplacements chimiques. Les constantes de couplage spin-spin (J) sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux est donnée par les lettres s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

2.2.2. La RMN CP-MAS

2.2.2.1. *Cross Polarization (CP)*

La détection de spins rares est difficile et ce d'autant plus que généralement leur rapport gyromagnétique est faible et leur temps de relaxation T_1 est long. Au contraire, les spins abondants (les protons) ont un fort rapport gyromagnétique et un temps T_1 bien plus court. Le principe de « Cross Polarization » est le transfert de la polarisation d'un système spins/noyau abondants vers un système spins/noyau rares. Dans le cas d'une « Cross Polarization » ^{29}Si - ^1H , les noyaux Si dans la proximité directe d'un proton sont mesurés et permettent de détecter des silanes sur une structure de SiO_2 .

2.2.2.2. *Magic Angle Spinning (MAS)*

La technique de la rotation à l'angle magique permet d'atténuer les effets d'élargissement des signaux dus aux interactions dipolaires et à l'anisotropie de déplacement chimique. L'échantillon est placé de sorte à ce qu'il fasse un angle de $54,7^\circ$ (tout en effectuant des rotations) avec l'axe du champ magnétique appliqué (B_0). A cet angle, la contribution anisotropique de déplacement chimique est réduite à zéro. En termes de résolution, le spectre obtenu présente une bonne corrélation avec celui obtenu en solution.

Les spectres en RMN CP-MAS du ^{13}C et RMN CP-MAS du ^{29}Si ($\nu = 100,48$ MHz et $79,39$ MHz respectivement) ont été réalisés par Yannick Coppel du Laboratoire de Chimie de Coordination sur un spectromètre Bruker Avance 400WB équipé d'une sonde de 4 mm.

La vitesse de rotation a été réglée à une fréquence de 8 kHz à l'angle magique, le temps de recyclage a été fixé à 5 s et un temps de contact de 2 et 3 ms a été appliqué respectivement pour les noyaux carbone et silicium.

2.3. Spectroscopie Infra-rouge à Transformée de Fourier (IRTF)

2.3.1. Analyse en transmission

Des mesures en transmission ont été réalisées sur un spectrophotomètre Bruker Vector 22 couplé au logiciel OPUS. Des spectres infra-rouge ont également été enregistrés dans le domaine 4000-400 cm^{-1} sur un spectrophotomètre Nexus Nicolet équipé d'un détecteur DTGS (Deuterated TryGlycerine Sulfate), au service commun d'Infra-rouge de l'Université Paul Sabatier par C. Routaboul. La résolution spectrale est de 1 cm^{-1} . Les échantillons sont analysés dans des pastilles de bromure de potassium. Cette technique fournit des informations sur la structure moléculaire des matériaux. Elle permet grâce à la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'identifier des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon.

2.3.2. Analyse par réflexion diffuse

Les spectres infra-rouge par réflexion diffuse sont enregistrés par C. Routaboul sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER IRTF 1760X équipé d'un détecteur DTGS. La résolution spectrale est de 4 cm^{-1} . Cette technique est adaptée à l'analyse *in situ* de poudres ayant une surface rugueuse, permettant à la lumière d'être réémise dans toutes les directions, les nanoparticules de silice remplissant ces critères.

2.4. Spectroscopie UV-visible

Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre VARIAN UV-vis NIR du modèle Cary 500 couplé au logiciel Cary Win UV à l'Institut de Chimie d'Araraquara. La zone d'absorption étudiée est comprise entre 250 et 900 nm avec une résolution de 1 nm. Une solution à différentes concentrations est introduite dans un tube de quartz de 1 cm x 1 cm x 3 cm pour les mesures.

2.5. Spectroscopie de masse

Les analyses ont été dirigées par C. Claparols au Service Commun de Masse. L'appareil utilisé dépend de l'analyse demandée. Les analyses FAB sont réalisées sur un spectromètre de masse NERMAG R10-10 permettant des analyses jusqu'à m/z 2000, équipé d'une source FAB (Fast Atom Bombardment). La matrice FAB utilisée est l'alcool 3-nitrobenzylique (MNBA). Les analyses par électrospray sont réalisées sur un spectromètre Q TRAP (Applied Biosystems) permettant des analyses jusqu'à m/z 3000.

2.6. Spectroscopie de Photo-électrons en Rayon X

Les spectres ont été enregistrés à l'Institut de Chimie d'Araraquara, SP, Brésil, sur spectromètre UNI-SPECS UHV piloté par le logiciel SPECSLAB 2. Les échantillons sont excités par la raie monochromatique MgK α (1253,6 eV) avec un angle d'émergence de 90°. Un ultravide de 10⁻⁹ mbar est appliqué. La déconvolution des courbes a été réalisée à l'aide du logiciel CasaXPS. La résolution en énergie sur la position des pics est de 0,1 eV. Cette technique permet d'étudier l'extrême surface du matériau, à 2-5 nm de profondeur, ainsi que l'identification formelle des groupements chimiques présents en surface.

2.7. Potentiel zêta

Les sols ont été analysés sur un MALVERN nanosizer ZS90 équipé d'un laser 633 nm couplé au logiciel zetasizer. Toutes les mesures ont été faites à 25 °C avec un angle de diffusion à 90°. Des solutions colloïdales aqueuses sont introduites dans une cellule capillaire recourbée, jetable, en polycarbonate. Le potentiel zêta est mesuré en appliquant un champ électrique à travers la dispersion. La tension appliquée pour toutes les expériences est fixé à 148 V.

2.8. Analyse thermogravimétrique (ATG)

En ATG/ATD les spectres sont enregistrés sur un Carlo Erba instrument EA 1110. La gamme de température étudiée est comprise entre 20-1000 °C sous un flux d'air à 1,5 L.h⁻¹. La température est stabilisée pendant une durée de 60 minutes à 20 °C, suivie d'une augmentation de la température de 5 °C par minute jusqu'à atteindre la température maximale. La descente en température est de 10 °C par minute. Une nacelle en platine est utilisée en référence.

2.9. Evaluation de la balance hydrophile/hydrophobe

2.9.1. Mesures de l'angle de contact

Les images sont prises sur un digidrop GBX DGD fast 60 couplé à une caméra numérique Nikon et à une source de lumière. Windrop++ est le logiciel utilisé. Le volume de la goutte d'eau est 4 μ L. Pour la mesure de l'angle de contact, des pastilles constituées uniquement du matériau à traiter sont préférées aux poudres pour plus d'homogénéité. L'angle que forme la goutte avec la pastille donne des informations sur le caractère hydrophile/lipophile de celle-ci; plus l'angle formé avec la pastille est grand plus le matériau est hydrophobe.

2.9.2. Mesures du coefficient de partage (P) et LogP

En chimie organique, le coefficient de partage (P) est largement utilisé pour évaluer le caractère hydrophile/lipophile d'une molécule. Si on considère le partage d'un soluté entre l'eau et un solvant non miscible, l'octanol, P est égal au rapport des concentrations du soluté dans les deux phases : $P = C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}}$

Les mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre PRIM 500 (330-900 nm). La source lumineuse est une lampe tungstène-halogène. La précision photométrique est de 2%. La longueur d'onde de travail est fixée à 480 nm, correspondant à une transition π - π^* du complexe. L'absorbance, à différentes concentrations connues, des échantillons dispersés dans l'octanol, l'eau et dans le mélange eau/octanol, est mesurée dans une cuvette en polystyrène 1 cm x 1 cm x 3 cm.

2.10. Microscopies électroniques

L'utilisation de la microscopie électronique permet diverses analyses sur les poudres : morphologie, forme, taille et homogénéité des particules.

2.10.1. Microscopie à balayage (MEB-FEG)

Les clichés sont obtenus sur un microscope JEOL JSM 6700 F avec canon à effet de champ. (Tension d'accélération de 0,5 à 30 kV, résolution de 10 Å à 15 kV ou 22 Å à 1 kV).

Quelques milligrammes de poudre sont mis en suspension dans l'éthanol puis quelques gouttes sont réparties sur un plot en acier. Les échantillons sont métallisés avec du titane pendant 30 secondes. Ces analyses ont été effectuées par Barbara Daffos et Pascal Lenormand au service commun de microscopie électronique de l'Université Paul Sabatier.

2.10.2. Microscopie à transmission (MET)

Les clichés sont obtenus sur un JOEL 2010 (tension d'accélératrice 200 kV, résolution 2,3 Å). Quelques milligrammes de poudre sont mis en suspension dans l'éthanol, puis une grille de cuivre recouverte de carbone amorphe est plongée dans le sol et est laissée sécher à température ambiante. Ces analyses ont été faites par Lucien Datas au service commun de microscopie électronique de l'Université Paul Sabatier.

2.11. Mesures de la taille des nanoparticules

2.11.1. Mesure par diffusion de la lumière (DLS)

Le diamètre qui est mesuré avec la DLS est appelé diamètre hydrodynamique et informe sur la façon dont la particule diffuse dans le fluide. Quand les particules sont irradiées avec le laser, l'intensité de la lumière diffuse fluctue à une vitesse qui est dépendante de la taille des particules. L'analyse de l'intensité de fluctuation donne des informations sur le mouvement brownien et donc sur la taille des particules en utilisant la relation Stokes-Einstein.

Les solutions colloïdales ont été analysées sur un MALVERN nanosizer ZS90 équipé d'un laser à 633 nm couplé au logiciel zetasizer. Toutes les mesures ont été faites à 20 °C avec un angle de diffusion à 90°. Les solutions colloïdales sont introduites dans une cuvette jetable en polystyrène 1 cm x 1 cm x 3 cm.

2.11.2. Mesures statistiques en microscopie électronique à transmission

Les mesures de diamètre des nanoparticules peuvent aussi être réalisées sur les images de MET. La détermination des diamètres est faite sur un minimum de 100 nanoparticules.

2.12. Photoluminescence (PL)

Les spectres de PL ont été effectués à l'Institut de Chimie d'Araraquara, SP, Brésil, sur un spectrofluorimètre HORIBA JOBIN YVON Fluorolog-3, modèle FL3-22.

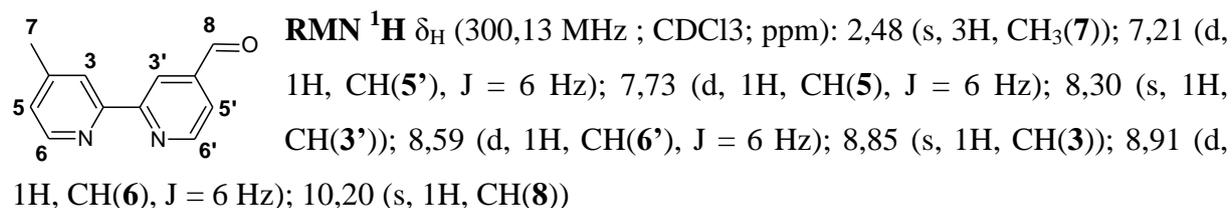
La lumière est produite dans le domaine spectral 200-900 nm par une lampe Xenon émettant en continu (400 W). Différentes longueurs d'onde d'excitation ont été appliquées ($\lambda_{\text{ex}} = 250, 325, 450$ et 500 nm) afin de déterminer les conditions optimales d'émission. Le signal d'émission est récupéré en position front-face, c'est-à-dire que le signal est recueilli à $22,5^\circ$ du faisceau incident. La résolution spectrale est de 0,2 nm. Les spectres d'excitation ont également été enregistrés.

3. Synthèse et Caractérisations du ligand et des complexes de Ruthénium

3.1. Formation du 4-aldéhyde-4'-méthylbipyridine : **1**¹⁰⁸

2,5 g (13,56 mmol) de 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine et 1,55 g (13,97 mmol) de dioxyde de sélénium sont mis en solution dans 100 mL de dioxane. Le mélange réactionnel est porté au reflux à 107 °C pendant 36 heures puis est filtré à chaud. Au bout d'une heure le filtrat est à

nouveau filtré puis est évaporé. La poudre obtenue est reprise dans 750 mL d'acétate d'éthyle et extraite une fois avec 50 mL d'une solution de Na_2CO_3 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, puis trois fois avec 75 mL d'une solution de Na_2SO_3 à $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée à $\text{pH} = 5$ par quelques mL d'HCl à 36%. La phase aqueuse de Na_2SO_3 est remise à pH basique par une solution de Na_2CO_3 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) avant d'être extraite quatre fois avec 100 mL de CH_2Cl_2 . Après avoir séché la phase organique sur Na_2SO_4 , le solvant est évaporé. Le composé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (1,03 g). Le rendement est de 50% après décompte du 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine n'ayant pas réagi (0,710 g).

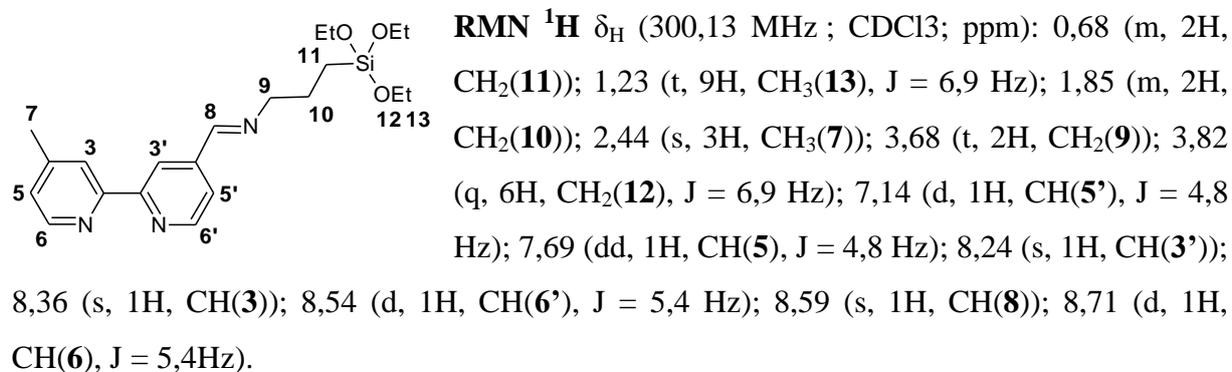


RMN ^{13}C δ_{C} (75,5 MHz; CDCl_3 ; ppm): 21,2 (1C, CH_3 (7)); 120,6 (1C, CH (3')); 121,4 (1C, CH (5')); 122,1 (1C, CH (5)); 125,4 (1C, CH (3)); 142,6 (1C, C(4)); 148,4 (1C, C(4')); 149,2 (1C, CH (6')); 150,3 (1C, CH (6)); 154,7 (1C, C(2')); 158,3 (1C, C(2)); 191,7 (1C, CH (8))

SM: (DCI/ NH_3) $m/z = 199,1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]

3.2. Formation du 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl)iminométhyl-2,2'-bipyridine : 2¹⁰⁸

1,03 g du composé **1** (5,19 mmol) et 1,208 mL de 3-aminopropyltriéthoxysilane (5,19 mmol) sont solubilisés dans 50 mL de CHCl_3 distillé. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant deux heures avant que le solvant soit évaporé. Le composé est obtenu sous la forme d'une huile jaune (2,08 g, 100%).



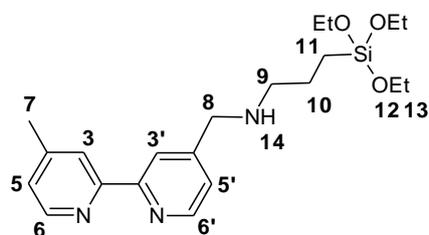
RMN ^{13}C δ_{C} (75,5 MHz; CDCl_3 ; ppm) : 8,0 (1C, CH_2 (11)); 18,3 (3C, CH_3 (13)); 21,2 (1C, CH_3 (7)); 24,1 (1C, CH_2 (10)); 58,4 (3C, CH_2 (12)); 64,4 (1C, CH_2 (9)); 120,57 (1C, CH (3')); 120,9 (1C, CH (5')); 122,0 (1C, CH (5)); 124,9 (1C, CH (3)); 144,2 (1C, C(4)); 148,1 (1C,

C(4')); 149,0 (1C, CH(6')); 149,5 (1C, CH(6)); 155,5 (1C, C(2')); 157,1 (1C, C(2)); 159,3 (1C, CH(8)).

SM: (DCI/NH₃) m/z=402,2 [M+H⁺]

3.3. Formation du ligand 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl)aminométhyl-2,2'-bipyridine : **(bpy-Si)**¹⁰⁸

1 g du composé 2 (2,49 mmol) et 0,190 g de borohydrure de sodium (4,98 mmol) sont solubilisés dans 120 mL d'éthanol distillé. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 18 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 50 mL d'eau distillée, puis trois extractions avec 50 mL de CH₂Cl₂ sont effectuées. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le composé est obtenu sous la forme d'une huile jaune (0,840 g, 83%).



RMN ¹H δ_H (300,13 MHz ; CDCl₃; ppm): 0,66 (m, 2H, CH₂(11)); 1,22 (t, 9H, CH₃(13), J = 6,9 Hz); 1,68 (m, 2H, CH₂(10)); 2,45 (s, 3H, CH₃(7)); 2,65 (m, 2H, CH₂(9)); 3,83 (q, 6H, CH₂(12), J = 6,9 Hz); 3,89 (s, 2H, CH₂(8)); 7,13 (d, 1H, CH(5'), J = 4,8 Hz); 7,32 (d, 1H, CH(5), J = 4,8 Hz); 8,23 (s, 1H, CH(3')); 8,33 (s, 1H, CH(3)); 8,53 (d, 1H, CH(6'), J = 4,8 Hz); 8,61 (s, 1H, CH(6), J = 4,8 Hz).

RMN ¹³C δ_C(75,5 MHz; CDCl₃; ppm) : 7,9 (1C, CH₂(11)); 18,3 (3C, CH₃(13)); 21,2 (1C, CH₃(7)) ; 23,4 (1C, CH₂(10)); 52,3 (1C, CH₂(9)); 53,4 (1C, CH₂(8)); 58,2 (3C, CH₂(12)); 120,4 (1C, CH(3')); 122,0 (1C, CH(5')); 124,1 (1C, CH(5)); 125,1 (1C, CH(3)); 148,1 (1C, C(4')); 149,0 (1C, CH(6')); 149,2 (1C, CH(6)); 150,8 (1C, C(4)); 156,0 (1C, C(2')); 156,3 (1C, C(2))

SM: (DCI/NH₃) m/z=404,2 [M+H⁺]

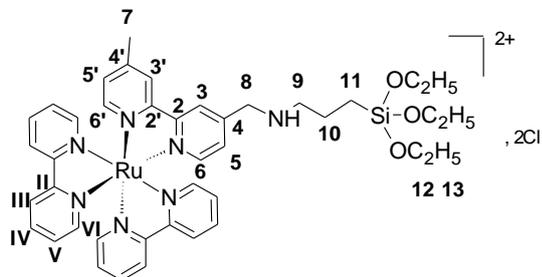
3.4. Synthèse des complexes de Ruthénium

3.4.1. Synthèse de [Ru(bpy)₂(bpy-Si)]Cl₂⁸¹

0,1 g de RuCl₂(bpy)₂ · 2H₂O (0,19 mmol) sont dissous dans 50 mL d'éthanol absolu dégazé par voie cryogénique puis 0,96 g du composé **3** (0,23 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté au reflux (90°C) pendant 3 jours puis le solvant est évaporé. Le résidu marron-orangé est repris dans un minimum de CH₂Cl₂ (~5mL) anhydre puis 20 mL d'éther diéthylique anhydre sont rajoutés pour faire précipiter le complexe. La solution est alors

filtrée et le solide séché. Le composé est obtenu sous la forme d'une poudre marron-orangé (0,143 g, 85%).

[Ru(bpy)₂(bpy-Si)]Cl₂



EA exp: C, 51,3; H, 5,8 ; N, 10,1. Calc. pour C₄₁H₄₉N₇O₃Cl₂SiRu: C, 55,5; H, 5,6; N, 11,0 %.

UV: λ_{max} (H₂O)/nm 252 (ε = L. mol⁻¹. cm⁻¹ 16750) 287 (59 350), 456 (5900).

IR: ν,δ/cm⁻¹ 3066 ν(CH_{ar}); 2971 ν_{as}(CH₃); 2923 ν_{as}(CH₂); 2882 ν_s(CH₃); 1638, 1617 ν(CN); 1599,

1463, 1444, 1420 ν(CC); 1380 δ(CH₂); 1240 ν(SiC); 1107, 1069 ν(SiOC₂H₅); 957 δ(SiO); 768 δ(CH_{ar}).

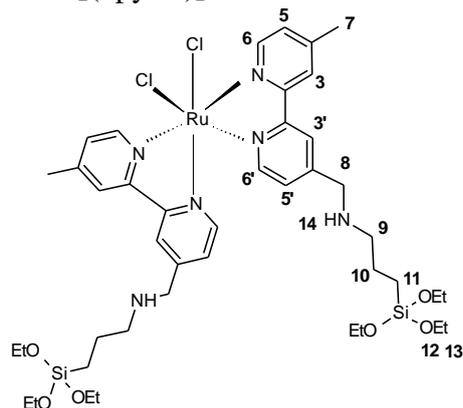
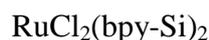
¹H RMN δ_H(300,13 MHz; MeOD; ppm) 0,69 (2H, m, CH₂, 11-H); 1,20 (9H, t, J_{AB} 6,9, CH₃, 13-H); 1,69 (2H, m, CH₂, 10-H); 2,60 (3H, s, CH₃, 7-H); 2,65 (2H, m, CH₂, 9-H); 3,55 (6H, q, J_{AB} 6,9, CH₂, 12-H); 3,98 (2H, s, CH₂, 8-H); 7,34 (1H, d, J_{AB} 5,7, CH, 5'-H); 7,50 (5H, m, CH, 5-H et V-H); 7,62 (1H, d, J_{AB} = 5,7, CH, 6'-H); 7,70 (1H, d, J = 5,7, CH, 6-H); 7,83 (4H, s, CH, IV-H); 8,13 (4H, m, CH, III-H); 8,61 (1H, s, CH, 3'-H); 8,72 (5H, m, CH, 3-H et VI-H).

¹³C RMN δ_C(75,5 MHz; MeOD; ppm) 9,1 (1C, CH₂, 11); 18,6 (3C, CH₃, 13); 21,5 (1C, CH₃, 7); 24,2 (1C, CH₂, 10); 53,0 (1C, CH₂, 9); 53,5 (1C, CH₂, 8); 58,5 (3C, CH₂, 12); 125,1 (1C, CH, 3'); 125,9 (4C, CH, III); 126,7 (1C, CH, 3); 128,4 (1C, CH, 5'); 129,1 (2C, CH, V); 130,1 (1C, CH, 5); 139,3 (4C, CH, IV); 151,9 (1C, C, 4'); 152,4 (2C, CH, 6, 6'); 152,8 (4C, CH, VI); 154,0 (1C, C, 4); 158,2 (1C, C, 2'); 158,5 (1C, C, 2); 158,8 (4C, C, II).

SM: (FAB) m/z 852 (M+H-HCl); 408, (M-2Cl).

3.4.2. Synthèse de RuCl₂(bpy-Si)₂⁸¹

0,060 g de RuCl₂(DMSO)₄ (0,12 mmol) sont dissous dans 10 mL d'éthanol anhydre dégazé par voie cryogénique puis 0,100 g du composé 3 (0,24 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté au reflux (90°C) pendant 2 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'acétone anhydre puis 20 mL d'éther diéthylique sont rajoutés pour faire précipiter le complexe. La solution est filtrée et le solide séché. Le composé est obtenu sous la forme d'une poudre marron (0,091 g, 77%).



IR: 2971 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2924 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2882 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1642, 1617 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1480 $\delta(\text{NH})$, 1450, 1419 $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{bpy}}$, 1389 $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1250 $\nu(\text{Si}-\text{C})$, 1166, 1105, 1076, 957 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5)$, 791 $\delta(\text{CH}_3)_{\text{ar}}$.

SM: (ESI) $m/z = 943 [\text{M}+\text{H}-\text{HCl}]^+$

UV: $\lambda_{\text{max}}(\text{EtOH})/\text{nm}$ 227 ($\epsilon = \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 20 450), 292 (23 100), 472 (5 650).

4. Synthèse des nanoparticules de silice bifonctionnelles

Les nanoparticules de silice ont été synthétisées par réaction de microémulsion inverse.

4.1. Microémulsion inverse

4.1.1. Système quaternaire

Pour des raisons de clarté, nous noterons les nanoparticules de silice incorporant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ par $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ et les nanoparticules encapsulant $\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$. Les nanoparticules de silice fonctionnalisées seront notées $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-X}$, X étant la molécule greffée. Le terme « encapsulant » sera réservé aux complexes n'ayant pas de fonction de greffage et le terme « incorporant » aux complexes possédant une fonction de greffage.

Synthèse des nanoparticules de 48 nm

Dans un ballon rond, 60 mL de cyclohexane, 14 mL de Triton X-100 et 14,2 mL d'hexanol sont mélangés. Puis 50 mg de complexe dissous dans 4 mL d'eau sont introduits pour former la microémulsion. Après stabilisation de la microémulsion, 800 μL de TEOS sont ajoutés goutte à goutte. 480 μL d'ammoniaque sont rajoutés, une attente de quinze minutes est souhaitable pour laisser le TEOS se répartir uniformément dans la microémulsion. La réaction est laissée sous forte agitation pendant 24 heures. Les nanoparticules sont récupérées par précipitation en cassant la microémulsion par ajout d'acétone ou d'éthanol. Les nanoparticules isolées sont lavées par centrifugation (10 000t/min pendant 10 min) à plusieurs reprises avec différents solvants successivement (eau, éthanol, éther). La poudre ainsi obtenue est séchée sous vide. On obtient une poudre orange (198 mg, 96%).

Ru(bpy-Si)@Si. $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$.

AE exp: C, 11,1; H, 2,0; N, 2,1. Calc. pour $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$: C, 10,3; H, 1,0; N, 2,1%.

ATG $\tau_{Ru} = 0,19 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT ν , δ/cm^{-1} 3636 $\nu(\text{OH})$; 1617 $\nu(\text{CN})$; 1560, 1541, 1466, 1448 $\nu(\text{CC})$; 1195 $\nu(\text{SiC})$; 1096 $\nu(\text{SiOSi})$; 957, 806 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11); 21 (7,10); 53 (9,8); 124 (3',III,3,5',V,5); 139 (IV); 150 (4',6,6',VI,4); 157 (2',2,II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -67 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -110 (Q^4).

Synthèse des nanoparticules de 68 nm

Dans un ballon rond, 60 mL de cyclohexane, 14 mL de Triton X-100 et 29 mL d'hexanol sont mélangés. Puis 50 mg de complexe dissous dans 4 mL d'eau sont introduits pour former la microémulsion. Après stabilisation de la microémulsion, 800 μL de TEOS sont ajoutés goutte à goutte. 480 μL d'ammoniaque sont rajoutés. Le traitement reste identique. On obtient une poudre orange (198 mg, 96%).

Ru(bpy-Si)@Si. $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$.

AE exp: C, 9,8; H, 1,6; N, 2,1. Calc. pour $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$: C, 10,3; H, 1,0; N, 2,1%.

ATG $\tau_{Ru} = 0,23 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT ν , δ/cm^{-1} 3636 $\nu(\text{OH})$; 1617 $\nu(\text{CN})$; 1560, 1541, 1466, 1448 $\nu(\text{CC})$; 1195 $\nu(\text{SiC})$; 1096 $\nu(\text{SiOSi})$; 957, 806 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11); 21 (7,10); 53 (9,8); 124 (3',III,3,5',V,5); 139 (IV); 150 (4',6,6',VI,4); 157 (2',2,II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -67 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -110 (Q^4).

Synthèse des nanoparticules de 38 nm

Dans un ballon rond, 60 mL de cyclohexane, 14 mL de Triton X-100 et 14,2 mL d'hexanol sont mélangés. Puis 50 mg de complexe dissous dans 10 mL d'eau sont introduits pour former la microémulsion. Après stabilisation de la microémulsion, 800 μL de TEOS sont ajoutés goutte à goutte. 480 μL d'ammoniaque sont rajoutés. Le traitement reste identique. On obtient une poudre orange (198 mg, 96%)

Ru(bpy-Si)@Si. $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$.

AE exp: C, 11,5; H, 1,8; N, 2,1. Calc. pour $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$: C, 10,3; H, 1,0; N, 2,1%.

ATG $\tau_{Ru} = 0,24 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT ν , δ/cm^{-1} 3636 $\nu(\text{OH})$; 1617 $\nu(\text{CN})$; 1560, 1541, 1466, 1448 $\nu(\text{CC})$; 1195 $\nu(\text{SiC})$; 1096 $\nu(\text{SiOSi})$; 957, 806 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ 10 (11); 21 (7,10); 53 (9,8); 124 (3',III,3,5',V,5); 139 (IV); 150 (4',6,6',VI,4); 157 (2',2,II).

^{29}Si CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ -67 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -110 (Q^4).

4.1.2. Système ternaire

Synthèse des nanoparticules de 25 nm

Dans un ballon rond, 60 mL de cyclohexane et 3 mL de NP-5 sont mélangés. Puis 13 mg de complexe dissous dans 560 μL d'eau sont introduits pour former la microémulsion. Après stabilisation de la microémulsion, 480 μL de TEOS sont ajoutés goutte à goutte. 360 μL d'ammoniaque sont rajoutés, une attente de quinze minutes est souhaitable. La réaction est laissée sous forte agitation pendant 24 heures. Les nanoparticules sont récupérées par précipitation en cassant la microémulsion en mettant de l'acétone ou de l'éthanol. Les nanoparticules isolées sont lavées par centrifugation (10 000 t/min pendant 10min) à plusieurs reprises avec différents solvants successivement (eau, éthanol, éther). La poudre ainsi obtenue est séchée sous vide. On obtient une poudre orange (86 mg, 66%).

Ru(bpy-Si)@Si. $\tau_{\text{Ru}} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$.

AE exp: C, 4,3; H, 1,0; N, 0,9. Calc. pour $\tau_{\text{Ru}} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$: C, 4,4; H, 0,4; N, 0,9%.

DRIFT ν , δ/cm^{-1} 3636 $\nu(\text{OH})$; 1617 $\nu(\text{CN})$; 1560, 1541, 1466, 1448 $\nu(\text{CC})$; 1195 $\nu(\text{SiC})$; 1096 $\nu(\text{SiOSi})$; 957, 806 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ 10 (11); 21 (7,10); 53 (9,8); 124 (3',III,3,5',V,5); 139 (IV); 150 (4',6,6',VI,4); 157 (2',2,II).

^{29}Si CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ -67 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -110 (Q^4).

Les mêmes expériences sont réalisées en absence de complexe pour des mesures de potentiel zêta et de taille des nanoparticules par la technique de diffusion de la lumière.

4.2. Fonctionnalisation en surface par réaction de greffage des organosilanes

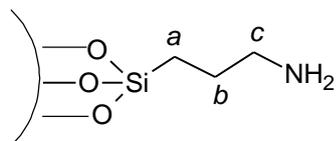
La fonctionnalisation des nanoparticules de silice a été faite en milieu anhydre.

Par cette méthode, on s'assure de greffer une monocouche à la surface des nanoparticules. Par conséquent le greffage n'est possible que par condensation des organosilanes sur les silanols via une réaction de substitution.

Toutes les expériences sont réalisées sous atmosphère inerte.

Les nanoparticules sont activées en chauffant légèrement à 50 °C pendant 30 minutes. 100 mg de nanoparticules activées sont redispersées dans 20 mL d'acétonitrile à l'aide d'un bain à ultrasons. A cette suspension de nanoparticules est ajoutée 47 μL de A (0,2 mmol), ou 168 μL de B (0,2 mmol), ou 168 μL de C (0,2 mmol), ou 185 μL de D (0,2 mmol), ou 42 μL de E (0,2 mmol), ou 64 μL de F (0,2 mmol). La quantité de molécules introduites est donnée par le ratio $\Omega = 2 \text{ mmol.g}^{-1}$. Le milieu est porté au reflux de l'acétonitrile pendant 24 heures. A la fin, le mélange est récupéré par centrifugation et est lavé à plusieurs reprises avec de l'éthanol et une fois dans l'éther diéthylique. La poudre ainsi obtenue est séchée en tirant sous vide dans 2 heures minimum.

Ru(bpy-Si)@Si-A. $\tau_A = 0,93\text{-}0,36 \text{ mmol.g}^{-1}$.



Particules de 25 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-A** : C, 13,7; H, 3,1; N, 2,2. Calc. pour $\tau_A = 0,93 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{\text{Ru}} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 7,7; H, 1,1; N, 2,2%.

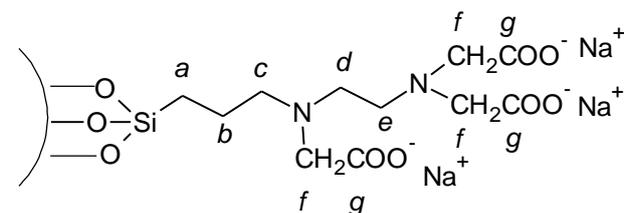
Particules de 48 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-A** : C, 11,3; H, 2,0; N, 2,6. Calc. pour $\tau_A = 0,36 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{\text{Ru}} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 11,6; H, 1,3; N, 2,6%. ATG $\tau_A = 0,51 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 2952 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$; 1619 $\nu(\text{CN})$; 1555, 1468 $\nu(\text{CC})$; 1448 $\delta(\text{NH})$; 1174 $\nu(\text{SiC})$; 1090 $\nu(\text{SiOSi})$; 954, 794 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ 10 (11,*a*); 21 (10,7,*b*); 43 (*c*); 125 (3',III,3); 128 (5',V,5); 139 (IV); 152 (4',6,6',VI,4); 157 (2',2,II).

^{29}Si CP MAS RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ -57 (T²); -67 (T³); -100 (Q³); -108 (Q⁴).

Ru(bpy-Si)@Si-B. $\tau_B = 0,18 \text{ mmol.g}^{-1}$.

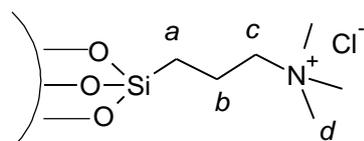


Particules de 25, 48, 68 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-B**: C, 13,5; H, 2,5; N, 2,6. Calc. pour $\tau_B = 0,18 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 13,3; H, 1,4; N, 2,6%. ATG $\tau_B = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$. **DRIFT** $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 1594 $\nu_{as}(\text{COO}^-)$; 1464, 1440 $\nu(\text{CC})$; 1407 $\nu_s(\text{COO}^-)$; 1326 $\nu(\text{CO})$; 1185 $\nu(\text{SiC})$; 1090 $\nu(\text{SiOSi})$; 959, 799 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11, *a*); 22 (7, 10, *b*); 52 (9, 8, *d, e*); 58 (*c, e*); 126 (3', III, 3, 5', V, 5); 139 (IV); 152 (4', 6, 6', VI, 4); 157 (2', 2, II); 179.9 (*g*).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -58 (T^2); -66 (T^3); -91 (Q^2); -100 (Q^3); -108 (Q^4).

Ru(bpy-Si)@Si-C. $\tau_C = 1,00-0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$.



Particules de 25 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-C**: C, 12,8; H, 2,8; N, 2,3. Calc. pour $\tau_C = 1,00 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 11,6; H, 1,9; N, 2,3%.

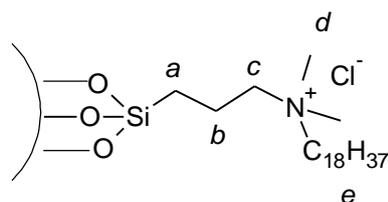
Particules de 48 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-C**: C, 11,4; H, 2,4; N, 2,4. Calc. pour $\tau_C = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 11,8; H, 1,3; N, 2,4%. ATG $\tau_C = 0,08 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 2951 $\nu_{as}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 2897 $\nu_s(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1621 $\nu(\text{CN})$; 1478 $\nu(\text{N}^+\text{CH}_3)$; 1467, 1446 $\nu(\text{CC})$; 1198 $\nu(\text{SiC})$; 1099 $\nu(\text{SiOSi})$; 955, 796 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11, *a*); 17 (*b*); 21 (7, 10); 53 (9, 8, *d*); 68.5 (*c*); 125 (3', III, 3); 128 (5', V, 5); 138 (IV); 151 (4', 6, 6', VI, 4); 157 (2', 2, II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -59 (T^2); -67 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -110 (Q^4).

Ru(bpy-Si)@Si-D. $\tau_D = 0,57 \text{ mmol.g}^{-1}$.



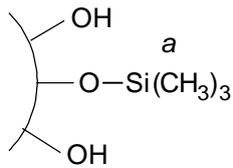
Particules de 25 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-D**: C, 20,7; H, 3,8; N, 1,7. Calc. pour $\tau_D = 0,57 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 20,1; H, 3,2; N, 1,7%.

DRIFT $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 2925 $\nu_{as}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)_{\text{intense}}$; 2851 $\nu_s(\text{CH}_3, \text{CH}_2)_{\text{intense}}$; 1595 $\nu(\text{CN})$; 1465 $\nu(\text{N}^+\text{CH}_3)_{\text{intense}}$; 1198 $\nu(\text{SiC})$; 1099 $\nu(\text{SiOSi})$; 950, 796 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11, *a*); 17 (*b*); 23 (7, 10); 30 (*e*); 51 (9, 8, *d*); 65 (*c*); 124 (3', III, 3, 5', V, 5); 138 (IV); 150 (4', 6, 6', VI, 4); 156 (2', 2, II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -59 (T^2); -67 (T^3); -100 (Q^3); -110 (Q^4).

Ru(bpy-Si)@Si-E. $\tau_E = 0,31-0,56 \text{ mmol.g}^{-1}$.



Particules de 25 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-E**: C, 5,5; H, 1,5; N, 1,3. Calc. pour $\tau_E = 0,31 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,09 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 5,5; H, 0,7; N, 1,3%.

ATG $\tau_E = 0,31 \text{ mmol.g}^{-1}$.

Particules de 48 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-E**: C, 13,1; H, 1,6; N, 2,1. Calc. pour $\tau_E = 0,56 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 13,1; H, 2,5; N, 2,1%.

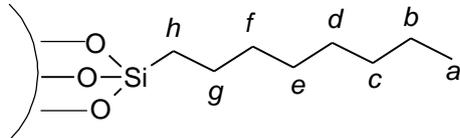
ATG $\tau_E = 0,68 \text{ mmol.g}^{-1}$

DRIFT $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 2961 $\nu_{as}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1619 $\nu(\text{CN})$; 1467, 1449 $\nu(\text{CC})$; 1423 $\nu(\text{Si}(\text{CH}_3)_3)$; 1185 $\nu(\text{SiC})$; 1090 $\nu(\text{SiOSi})$; 959, 799 $\delta(\text{Si-O})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 0 (*i*); 10 (11); 21 (10, 7); 125 (3', III, 3); 128 (5', V, 5); 139 (IV); 151 (4', 6, 6', VI, 4); 157 (2', 2, II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm 12 (M^0); -67 (T^3); -101 (Q^3); -109 (Q^4).

Ru(bpy-Si)@Si-F. $\tau_E = 0,11 \text{ mmol g}^{-1}$.



Particules de 48 nm : AE pour **Ru(bpy-Si)@Si-F**: C, 12,1; H, 1,4; N, 2,0. Calc. pour $\tau_F = 0,11 \text{ mmol.g}^{-1}$ (avec $\tau_{Ru} = 0,21 \text{ mmol.g}^{-1}$): C, 12,1; H, 2,2; N, 2,1%.

ATG $\tau_F = 0,20 \text{ mmol.g}^{-1}$.

DRIFT $\nu, \delta/\text{cm}^{-1}$ 2966 $\nu_{as}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 2927 $\nu_{as}(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 2860 $\nu_s(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$; 1605 $\nu(\text{CN})$; 1466, 1447 $\nu(\text{CC})$; 1427 $\delta(\text{CH}_2)$; 1188 $\nu(\text{SiC})$; 1094 $\nu(\text{SiOSi})$; 959, 800 $\delta(\text{SiO})$.

^{13}C CP MAS RMN δ_C/ppm 10 (11, *a*); 21 (10, 7, *b*); 53-57 (*c-h*); 125 (3', III, 3, 5', V, 5); 138 (IV); 150 (4', 6, 6', VI, 4); 156 (2, 2', II).

^{29}Si CP MAS RMN δ_C/ppm -68 (T^3); -92 (Q^2); -101 (Q^3); -109 (Q^4).

B- Elaboration des biofilms *P. aeruginosa*

1. Matériels

- Microplaques stériles 24 puits en polystyrène (Falcon ®)
- Microplaques stériles 6 puits en polystyrène (Falcon ®)

- Bain à ultrasons
- Filtres de porosité de 0,20 µm
- Leica® confocal software, LCS (INRA, Auzeville, IFR 40)

2. Souche utilisée

Les essais ont été effectués avec la souche référencée PAO1 (Collection Institut Pasteur, Paris).

3. Conservation, entretien et identification de la souche

La conservation de la souche est réalisée à -80°C en bouillon Eugon (Biomérieux®) additionné de 5% de glycérol (AES). Avant toute manipulation, la souche est décongelée à température ambiante et repiquée deux fois sur gélose trypticase-soja selon les recommandations de la norme NF EN 12353 (Antiseptiques et désinfectants chimiques. – Conservation des organismes test utilisé pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide). Le milieuensemencé est incubé à 37 ± 2 °C en aérobiose pendant 24 heures.

L'identification de la souche est contrôlée, après vérification de la pureté, par l'étude des caractères morphologiques et macroscopiques (mobilité et coloration de Gram).

4. Milieux de culture

Deux milieux de culture pour la formation de biofilms sont utilisés.

- Bouillon Trypticase-Soja (TSA-B) (Biomérieux®, France)
- Bouillon Biofilm Modifié (BBM) mis au point par P. Khalilzadeh¹²⁹

MgSO ₄ , 2H ₂ O	0,2 g/L
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0005 g/L
Na ₂ HPO ₄ anhydre	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄	0,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma® Aldrich)	0,1 g/L
Glucose (Fluka®)	0,05 g/L

¹²⁹ Khalilzadeh, P.; Lajoie, B.; El Hage, S.; Furiga, A.; Baziard, G.; Berge, M.; Roques, C., *Can. J. Microbiol.* **2010**, *56*, 317-325.

5. Elaboration des biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*

Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur microplaques de 24 puits et l'observation des biofilms en microscopie confocale est réalisée sur microplaques de 6 puits. Dans les deux cas, les concentrations sont conservées.

Une suspension de *P. aeruginosa* a été préparée dans de l'eau distillée stérile. La concentration bactérienne est évaluée par mesure spectrophotométrique à 640 nm. Une transmission à 70% correspond à une suspension titrant environ 10^8 UFC/mL. À partir de cette suspension mère, des dilutions de raison 10 sont réalisées dans de l'eau distillée stérile pour avoir un inoculum à 10^5 UFC/mL. 100 μ L (ou 300 μ L) de l'inoculum de *P. aeruginosa* sont introduits dans les puits d'une microplaque 24 puits (microplaque 6 puits) contenant 2 mL (6mL) de milieu BBM. Tous les puits de la microplaque ont été inoculés avec la même suspension bactérienne initiale et traités de la même manière pendant la formation du biofilm. Les microplaques ont été incubées 72 heures à 37 ± 2 °C. Le milieu de culture a été renouvelé 2, 4, 6, 20, 24 et 48 heures après l'inoculation afin de favoriser la croissance des bactéries adhérentes et éliminer les bactéries planctoniques présentes dans le puits. Les puits ont été vidés délicatement, rincés deux fois avec 2 mL (6 mL) d'eau distillée stérile, puis sont introduits à nouveau 2 mL (6 mL) de milieu BBM. Pour chaque microplaque, un témoin positif a été effectué ainsi qu'un témoin négatif (puits non inoculé pour s'assurer de la stérilité du milieu). La concentration finale en bactéries est de 5.10^3 UFC/mL.

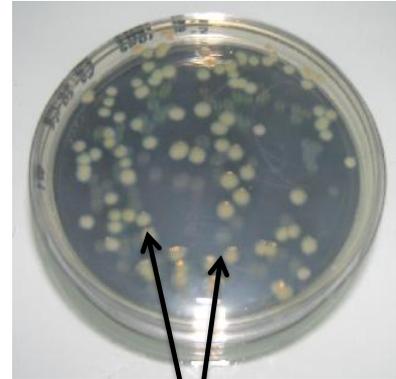
C- Exploration des biofilms avec des nanoparticules de silice bifonctionnelles

1. Préparation des suspensions de nanoparticules

Dans 10 mL de milieu BBM sont introduits 5 mg de nanoparticules. Cette suspension à 0,5 mg/mL est placée dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour disperser les nanoparticules. Une dilution à raison de 10 est réalisée pour obtenir une solution fille à 0,05 mg/mL qui est placée à nouveau dans le bain à ultrasons pendant 30 min. La suspension est filtrée à travers un filtre de porosité 0,20 μ m puis 2 mL (ou 6 mL) du filtrat contenant les nanoparticules de silice sont placés dans les puits contenant les biofilms de 72 heures. La filtration permet de stériliser la suspension et d'éliminer les agrégats.

2. Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules de silice luminescentes sur le biofilm par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC)

Principe : Cette technique sert à évaluer le nombre de bactéries qui se trouvent dans le milieu souhaité. Il s'agit simplement d'une suite de dilutions suivie d'un prélèvement d'un volume connu qui sera étalé ou inclus dans un milieu de culture gélosé. Il suffira ensuite de compter le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC), et connaissant le volume de suspension (en général 1 mL sur une boîte), on en déduira la quantité approximative de bactéries dans le milieu étudié. On considère qu'1 UFC correspond à 1 bactérie. Sur le milieu de culture gélosé (TSA), les bactéries *P. aeruginosa* forment des taches plus ou moins jaunes/vertes. Ce sont ces taches qui sont appelés Unités Formant Colonies.



Unités Formant Colonies (UFC)

Par exemple, 100 UFC sont dénombrées sur milieu gélosé, suite à l'inclusion d'une suspension bactérienne de 1mL préalablement diluée à raison de 10 à 6 reprises. La suspension initiale dénombre $(UFC \times dilution) / volume \text{ (en mL)} = 10^8 \text{ UFC/mL}$.

Les expériences de cytotoxicité sont réalisées avec les nanoparticules de 48 et 68 nm dans des microplaques 24 puits. Les particules sont introduites sur un biofilm de 72 heures. Le temps de contact est fixé à 24 heures. Les microcolonies de chaque puits (2 mL) sont récoltées par grattage avec une spatule stérilisée à la flamme. A partir des différentes suspensions obtenues, des dilutions de raison 10 à 5 reprises sont réalisées en eau distillée stérile. Le dénombrement est réalisé dans le milieu Trypcase-soja par inclusion (1 mL des différentes dilutions). Les milieux ensemencés sont incubés à $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en aérobiose durant 48 heures et les UFC sont dénombrées.

3. Observation en microscopie confocale

La microscopie confocale est l'outil actuel le plus adapté pour la visualisation *in situ* des biofilms.

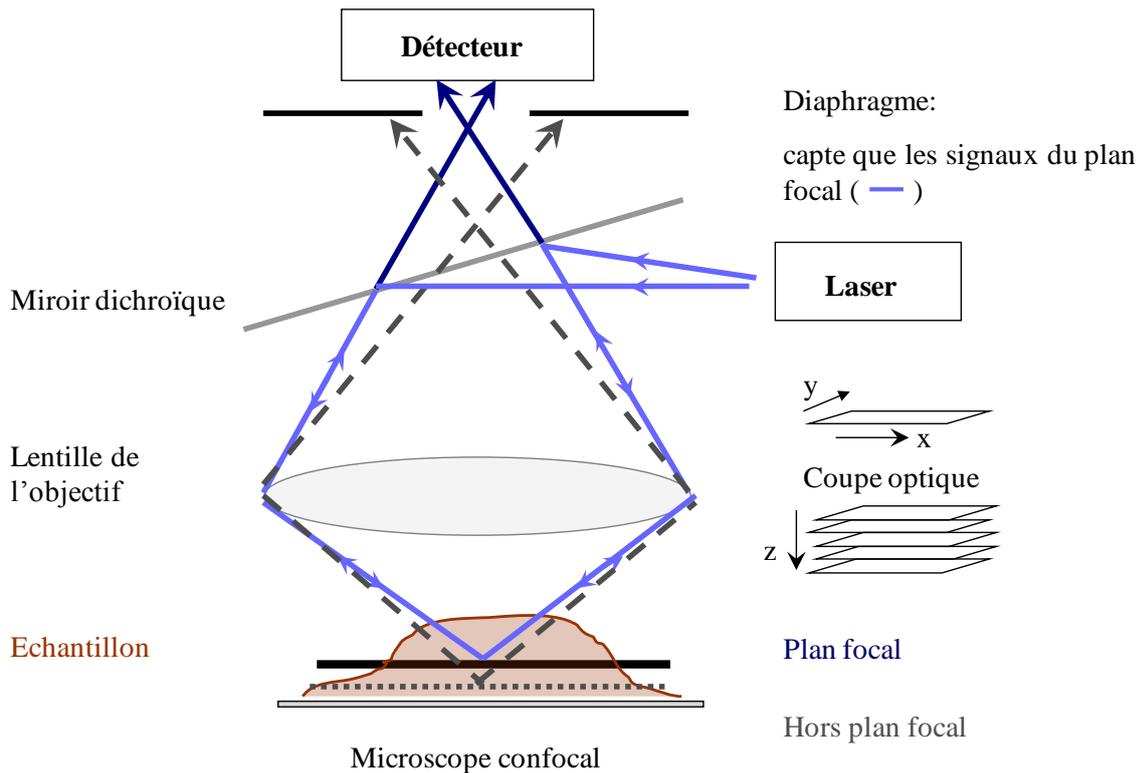


Schéma 1 – Principe de la microscopie confocale

➤ Technique

La microscopie confocale est un outil performant permettant d'obtenir des images en trois dimensions, même pour des échantillons épais, de très bonnes résolutions. La lumière provenant du laser est réfléchi par le miroir dichroïque et est focalisée par l'objectif sur une petite surface de l'échantillon. Quand l'échantillon est excité, il émet de la lumière qui est collectée par l'objectif et est renvoyée vers le détecteur. Grâce à un diaphragme situé devant le détecteur et dans un plan conjugué au plan focal de l'objectif, seuls les rayons provenant du plan focal de l'objectif atteindront le détecteur. Tous les autres rayons provenant de plans hors-focaux seront arrêtés par le diaphragme. Ceci contribue à avoir des images nettes et permet de définir des coupes optiques de l'échantillon permettant à la reconstitution de l'échantillon en trois dimensions.

➤ Intérêt

L'intérêt de la microscopie confocale est double en ce qui concerne l'étude des biofilms. Tout d'abord, le principal atout de la microscopie confocale est la possibilité d'observer des biofilms « vivants » (quelques dizaines de micromètres d'épaisseur) en milieu aqueux, observation rendue possible par des objectifs à immersion. D'un point de vue structurel, cette technique permet de conserver et d'étudier les biofilms dans leur état naturel, contrairement à

la microscopie électronique qui nécessite au préalable une déshydratation de l'échantillon. De plus la préparation de l'échantillon pour observation est quasi-inexistante. Le second intérêt de la microscopie confocale est la reconstitution des images en trois dimensions, grâce à un balayage de chaque coupe optique (appelé stack) suivant x et y et suivant un incrément dz. Plus dz est faible, meilleure est la reconstitution.

Dans notre cas pour l'étude de la pénétration de particules au sein du biofilm, l'intérêt de la microscopie confocale est également la possibilité de faire des doubles voire triples marquages, permettant ainsi de différencier les bactéries formant le biofilm, de l'EPS et des nanoparticules.

En annexe I, quelques caractéristiques des différents marqueurs utilisés sont développées (formule, spectres d'excitation e d'émission, informations générales...).

3.1. Marquage des bactéries

Le SYTO 9® est un marqueur d'acides nucléiques (ADN et ARN) présents à l'intérieur et à l'extérieur des bactéries permettant leur visualisation en microscopie confocale. Lorsque le SYTO 9® est lié aux acides nucléiques, il présente une émission de fluorescence intense dans le vert ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$). Pour les observations un volume de 0,5 μL de SYTO 9® est introduit directement dans chaque puits sans rinçage préalable.

➤ Test de viabilité des bactéries par marquage LIVE/DEAD® BacLight™ Invitrogen

Ce test est un double marquage des bactéries par le SYTO 9® et l'iodure de propidium permettant de discriminer les bactéries vivantes des bactéries endommagées. Le SYTO 9® étant capable de diffuser dans les membranes cellulaires, il parvient à marquer toutes les bactéries qu'elles soient mortes ou vivantes. Par contre, l'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant d'acides nucléiques et est incapable de pénétrer dans les membranes intactes. Ainsi l'IP ne marque que les bactéries mortes ou endommagées. L'IP est excité à $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ et émet dans le rouge ($\lambda_{em} = 575 - 700 \text{ nm}$). Pour les expériences, 0,5 μL de SYTO 9® et 0,5 μL d'IP sont ajoutés directement dans le puits sans rinçage préalable. Ainsi les bactéries viables apparaissent vertes alors que les bactéries endommagées ou mortes apparaissent rouges orangées.

3.2. Marquage de l'EPS

Le marquage de l'EPS se fait classiquement par des lectines. Dans cette étude, nous avons opté pour la Concanavaline A (Con A) conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor® 633 qui a une affinité pour les résidus α -mannopyranosyl et α -glucopyranosyl. Le protocole de marquage a été adapté de la méthode décrite par Neu *et al.*³⁰ Les puits contenant les biofilms ont été vidés délicatement et 1 mL de Con A (100 μ g/mL, dans une solution de 0,1 M de bicarbonate de sodium) a été ajouté. Les microplaques sont placées à l'obscurité pendant 20 min, puis vidées et rincées délicatement 2 fois, avec 1 mL d'eau distillé stérile. 6 mL d'eau distillée stérile ont ensuite été ajoutés. L'observation peut avoir lieu.

3.3. Acquisition des images en microscopie confocale

Les clichés des biofilms sont enregistrés sur un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 équipé d'une caméra droite et de différentes sources de lasers (458, 476, 488, 514, 543 et 633 nm). Un objectif à immersion dans l'eau (63 x 1,2 NA) est monté pour l'observation directe des biofilms. Pour éviter le débordement en émission d'un canal à un autre, **toutes les acquisitions sont faites en mode séquentiel**. Ce mode permet de faire des acquisitions de plusieurs marqueurs séparément, les uns après les autres. Par exemple, dans ce mode, le marqueur A est excité à un $\lambda_{exc}(A)$ donné puis son émission est récolté à un $\lambda_{em}(A)$ donné dans le canal 1, puis le marqueur B est excité à un $\lambda_{exc}(B)$ donné puis son émission est récolté à un $\lambda_{em}(B)$ donné dans le canal 2 et ainsi de suite.

Viabilité des bactéries : Le SYTO 9® est excité à 488 nm avec le laser Argon à 25% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le DD 488/543. La fluorescence émise est collectée entre 498 nm et 533 nm. L'IP est excité à 543 nm avec le laser GreNe à 25% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le DD 488/543. La fluorescence émise est collectée entre 553 nm et 675 nm.

Marquage de l'EPS par la Con A conjugué au fluorochrome Alexa Fluor®633 : Le Con A est excité à 633 nm avec le laser HeNe à 50% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le TD 488/543/633. La fluorescence est collectée entre 673 et 790 nm.

Triple marquage des cellules bactériennes, de l'EPS et des nanoparticules de silice luminescentes : Le SYTO 45® est excité à 458 nm avec le laser Argon à 10% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le DD 458/514. La fluorescence émise est collectée entre 468 nm et 488 nm. La Con A conjugué au fluorochrome Alexa Fluor®488 est excité à 488

nm avec le laser Argon à 10% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le DD 488/543. La fluorescence émise est collectée entre 498 nm et 533 nm. Les nanoparticules sont excitées à 543 nm avec le laser GreNe à 50% de sa puissance et le miroir dichroïque utilisé est le DD 488/543. La fluorescence émise est collectée entre 600 nm et 700 nm.

Nous nous sommes assurés que le SYTO 45® (fluorochrome bleu) n'émet pas dans le canal de la Con A-Alexa Fluor®488 (fluorochrome vert) et que Con A-Alexa Fluor®488 n'émet pas dans le canal des nanoparticules (rouge). Par exemple, dans le cas nanoparticules luminescentes, nous avons vérifié si en excitant à 543 nm que Con A-Alexa Fluor®488 n'émettait pas dans la zone comprise entre 600 et 700 nm. Les spectres d'émission des tests de débordements sont en annexe II.

Le balayage se fait dans la direction xy et les tranches d'images sont enregistrées suivant z avec un incrément variant de 0,41 µm.

3.4. Traitements des images

Les images sont traitées avec le logiciel Image J version 1.24i (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Les pluggins « volume viewer » et « volumeJ » permettent la reconstitution tridimensionnelle des images acquises en microscopie confocale. Des profils d'intensité en fonction de z sont obtenus en sélectionnant « Image » localisée dans la barre de menu, puis « Stack » et « Plot Z-axis profile ».

Chapitre III

Nanoparticules de silice bifonctionnelles

1. Complexes de Ruthénium(II)	84
1.1. Synthèse et Caractérisation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$	84
1.1.1. Synthèse du ligand (bpy-Si).....	84
1.1.2. Synthèse et caractérisation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$	85
1.2. Synthèse et caractérisation de $\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2$	91
2. Synthèse de nanoparticules de silice luminescentes par microémulsion inverse	93
2.1. Protocole de référence.....	93
2.2. Synthèse de nanoparticules de silice luminescentes de tailles variées.....	95
2.2.1. Système quaternaire.....	95
2.2.2. Système ternaire.....	99
2.3. Caractérisations des nanoparticules de silice luminescentes	101
2.3.1. Détermination des taux d'incorporation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$	101
2.3.2. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules luminescentes à l'état solide.....	102
2.3.3. Evaluation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en solution.....	106
3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice luminescentes	107
3.1. Greffage en milieu anhydre des organosilanes sur les particules de silice luminescentes	108
3.2. Caractérisations des nanoparticules de silice luminescentes fonctionnalisées.....	110
3.2.1. Caractérisations physico-chimiques par RMN du solide et DRIFT	110
3.2.2. Caractérisations physico-chimiques de l'extrême surface des nanoparticules	114
3.2.3. Evaluation du caractère hydrophile-hydrophobe des nanoparticules de silice fonctionnalisées.....	119
4. Propriétés de luminescence des nanoparticules en solution	122
4.1. Spectre d'excitation et d'émission de $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$	123
4.2. Effet de la fonctionnalisation	124
4.3. Effet du pH	125
4.4. Tentative de détermination du rendement quantique pour les nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ et $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-X}$	125
5. Conclusion	126

Le but de ce chapitre est de présenter la synthèse des nanoparticules de silice luminescentes contenant des complexes métalliques de Ruthénium(II) choisis pour leur propriété de photoluminescence. Pour cela nous avons synthétisé et caractérisé deux nouveaux complexes de ruthénium(II) constitués de ligands de type bipyridine, l'un cationique et l'autre moléculaire. Afin d'incorporer ces complexes de façon covalente à la matrice de silice, un ligand bipyridine bifonctionnel, bpy-Si, ayant une fonction d'ancrage et deux sites de complexation, est utilisé (Schéma III.1).

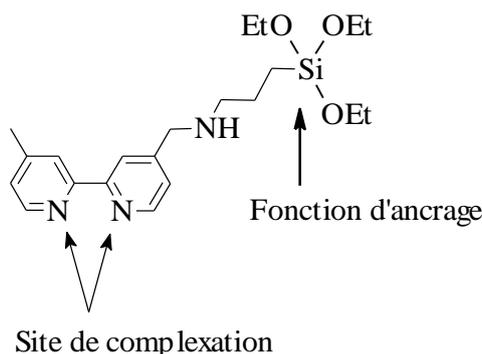


Schéma III.1 - Structure du ligand bipyridine bifonctionnel (bpy-Si)

Une fois synthétisés et caractérisés ces complexes de ruthénium(II) sont incorporés dans les nanoparticules de silice afin de les rendre luminescentes. Pour cela nous avons fait appel à la méthode de Stöber en milieu de microémulsion inverse. Nous avons souligné dans l'étude bibliographique qu'aucun complexe de ruthénium(II) silylé n'avait été incorporé par la méthode de Stöber, justifiant ainsi notre choix à travailler en microémulsion inverse. De plus cette méthode permet un bon contrôle de la taille des nanoparticules de silice avec une faible polydispersité. L'objectif de la thèse est d'utiliser ces nanoparticules pour explorer des biofilms. Il est donc primordial que les particules soient monodisperses pour éviter les effets de taille, et de contrôler les propriétés de surface (particules hydrophobes, hydrophiles ayant des charges positives ou négatives) qui vont conditionner les interactions avec le biofilm. Ainsi nous avons élaboré des particules de tailles et de propriétés de surface différentes. Les nanoparticules qu'elles soient fonctionnalisées ou non ont été totalement caractérisées d'un point de vue physico-chimique.

L'étude bibliographique a montré que pour élaborer les particules de silice bifonctionnelles, la meilleure stratégie est d'élaborer en une étape des nanoparticules luminescentes puis de fonctionnaliser par greffage la surface des nanoparticules. Ce chapitre est donc organisé en quatre parties. Dans un premier temps, nous présenterons les synthèses et caractérisations des complexes de ruthénium(II), suivi de l'incorporation de ces derniers dans les nanoparticules

de silice. Une fois les nanoparticules luminescentes synthétisées, nous passerons à la fonctionnalisation de la surface par des réactions de greffage avec des organosilanes et enfin nous étudierons les propriétés de luminescence des nanoparticules bifonctionnelles.

1. Complexes de Ruthénium(II)

Au laboratoire, S. Cousinié a élaboré plusieurs complexes de ruthénium dont $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})](\text{BF}_4)_2$ (bpy-Si étant 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl) aminométhyl-2,2'-bipyridine) qui présente de bonnes propriétés de luminescence. Cependant, son incorporation conduit à la formation de nanoparticules non sphériques, irrégularité que nous avons attribuée au manque de solubilité du complexe. Pour augmenter sa solubilité nous avons synthétisé le dérivé chloré $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$. Notons que dans la bibliographie, il est très fréquent de trouver des complexes du type $[\text{Ru}(\text{pp})_2(\text{pp}')]\text{X}_2$ avec pp, pp' pouvant être des ligands bipyridine, bipyrimidine, phénanthroline, bipyrazine et $\text{X} = (\text{PF}_6^-)^{130-133}$ ou $(\text{ClO}_4^-)^{134,135}$ contrairement à $\text{X} = (\text{Cl})^{93,74,136,137}$

Le second complexe obtenu, $\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2$, ne contient que des ligands bipyridines silylés et est moléculaire.

1.1. Synthèse et Caractérisation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$

1.1.1. Synthèse du ligand (bpy-Si)

Comme décrit dans la bibliographie, des nanoparticules de silice luminescentes fonctionnalisées sont largement employées pour des applications axées sur la reconnaissance^{138,139} et la détection⁶⁵ d'entités biologiques ciblées (bactéries pathogènes, cellules cancéreuses...). Ces luminophores sont souvent retenus par la matrice de silice via des interactions électrostatiques. Or il est crucial que le relargage ou lessivage de ces luminophores n'ait pas lieu pour diverses raisons, mais entre autre, pour que le marquage des

¹³⁰ Strouse, G. F.; Anderson, P. A.; Schoonover, J. R.; Meyer, T. J.; Keene, F. R., *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3004-6.

¹³¹ Ioachim, E.; Medlycott, E. A.; Skene, W. G.; Hanan, G. S., *Polyhedron* **2007**, *26*, 4929-4935.

¹³² Anderson, P. A.; Deacon, G. B.; Haarmann, K. H.; Keene, F. R.; Meyer, T. J.; Reitsma, D. A.; Skelton, B. W.; Strouse, G. F.; Thomas, N. C.; et, a., *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6145-57.

¹³³ Amouyal, E.; Penaud-Berruyer, F.; Azhari, D.; Ait-Haddou, H.; Fontenas, C.; Bejan, E.; Daran, J.-C.; Balavoine, G. G. A., *New J. Chem.* **1998**, *22*, 373-380.

¹³⁴ Xiong, Y.; He, X.-F.; Zou, X.-H.; Wu, J.-Z.; Chen, X.-M.; Ji, L.-N.; Li, R.-H.; Zhou, J.-Y.; Yu, K.-B., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 19-24.

¹³⁵ Goswami, S.; Chakravarty, A. R.; Chakravorty, A., *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 2246-50.

¹³⁶ Heseck, D.; Inoue, Y.; Everitt, S. R. L.; Ishida, H.; Kunieda, M.; Drew, M. G. B., *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 308-316.

¹³⁷ Wu, X.; Cong, Y.; Liu, Y.; Ying, J.; Li, B., *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, *49*, 355-363.

¹³⁸ Tan, W.; Wang, K.; He, X.; Zhao, X. J.; Drake, T.; Wang, L.; Bagwe, R. P., *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 621-638.

¹³⁹ He, X.; Duan, J.; Wang, K.; Tan, W.; Lin, X.; He, C., *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2004**, *4*, 585-589.

entités ciblées reste spécifique. L'interaction électrostatique entre les milliers de luminophores et la matrice de silice est bien trop faible pour éviter le relargage d'où la nécessité d'introduire dans les nouveaux complexes au minimum un ligand possédant une fonction de greffage à la silice. Dans cette optique, le ligand bpy-Si que nous avons utilisé pour la synthèse de nouveaux complexes de Ruthénium(II), a été mis au point au laboratoire par Sandra Cousinié *et al.*¹⁰⁸ (Schéma III.2).

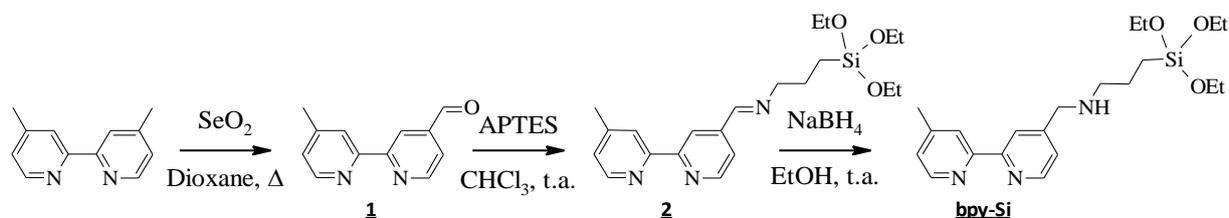


Schéma III.2 – Synthèse de bpy-Si

Trois étapes sont nécessaires à l'obtention du ligand (bpy-Si). La première met en jeu la 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine au reflux dans le dioxane en présence d'un oxydant, le dioxyde de sélénium, qui conduit au 4-aldéhyde-4'-méthyl-2,2'-bipyridine (**1**) avec un faible rendement. L'étape suivante est la condensation de l'APTES, une amine, sur l'aldéhyde (**1**) dans du chloroforme anhydre à température ambiante donnant lieu à une imine (**2**), puis cette dernière est réduite en amine à l'aide du borohydrure de sodium dans de l'éthanol absolu anhydre pour aboutir au 4-méthyl-4'-(N-triéthoxysilylpropyl) aminométhyl-2,2'-bipyridine (**bpy-Si**) avec un rendement final de 50%. Bien que l'hydrolyse des groupements triéthoxysilyle soit lente les solvants utilisés sont distillés et les réactions sont faites à l'abri de l'air, sous atmosphère d'azote.

1.1.2. Synthèse et caractérisation de $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$

Dans la bibliographie, peu d'auteurs^{74,93,136,137} décrivent l'obtention de complexes de ruthénium de type $[Ru(pp)_2(pp')]Cl_2$, en conservant les contre-ions chlorure où pp et pp' sont des ligands bipyridine ou phénanthroline. Le précurseur pour toutes ces réactions est $RuCl_2(pp)_2$. La réaction est réalisée par les auteurs^{74,93,136,137} dans un solvant alcoolique (EtOH ou MeOH) ou dans un mélange alcool/ H₂O au reflux en présence de 1 à 1,1 équivalent de ligand pendant une durée comprise entre 5 h et 12 h. Lorsque la fonction silane présente des groupements éthoxy, le solvant qui s'impose est l'éthanol. En effet, en milieu alcoolique, il existe des réactions d'échange entre le solvant et les fonctions éthoxy des silanes, et l'utilisation du méthanol conduirait à l'espèce indiquée dans le Schéma III.3.

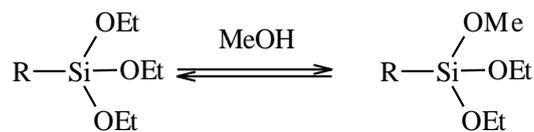
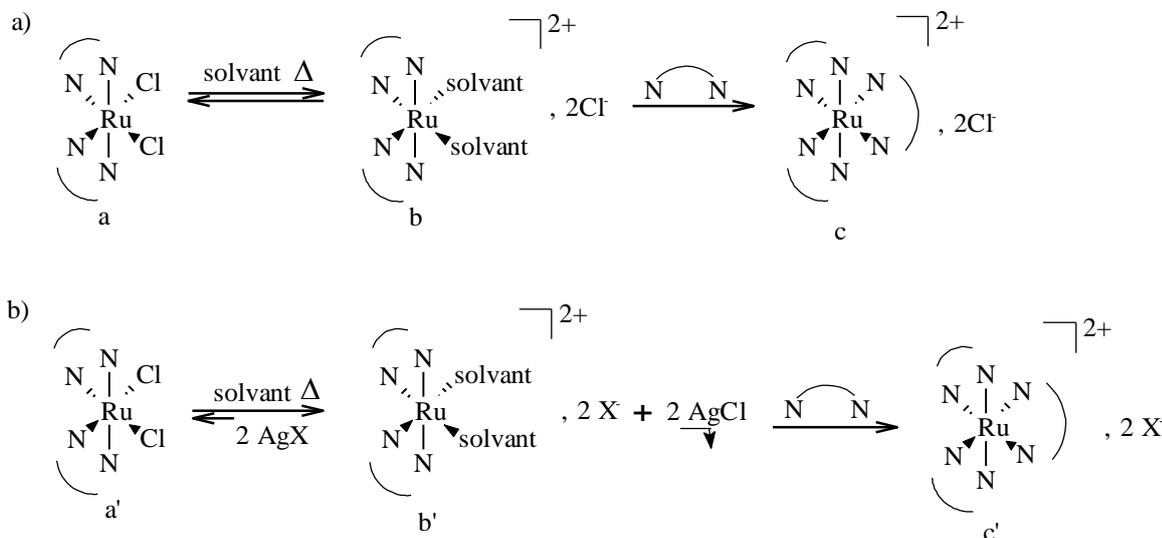


Schéma III.3 – Réaction d'échange entre les groupements éthoxy et méthoxy

En appliquant ces durées de réaction, nous avons obtenu le complexe avec un rendement relativement faible de 30% alors que les rendements atteints par les auteurs^{74,93,136,137} sont compris entre 58 et 85%. Pour améliorer le rendement, nous avons augmenté le temps de réaction, passant à 3 jours au reflux. Après concentration du solvant et ajout du mélange Et₂O/CHCl₃, il se forme un précipité qui est récupéré par filtration. Le complexe obtenu est rouge orangé avec un rendement de 85%. Nous n'avons pas d'explication sur le fait qu'il faille chauffer pendant 3 jours pour avoir un rendement correct. Sullivan *et al.*¹²⁶ ont montré qu'en milieu aqueux alcoolique, la réaction se décomposait en 2 étapes, comme illustré dans le Schéma III.4a. La première étape est la formation d'un intermédiaire **b** qui résulte de la substitution des chloros de la sphère de coordination par le solvant, c'est l'étape limitante de la réaction et elle ne fait pas intervenir le ligand. La seconde étape est la substitution des molécules de solvant faiblement coordonnant par un ligand.

Si dans la bibliographie, il est plus fréquent de trouver des complexes de [Ru(pp)₂(pp')](X)₂ avec X = PF₆⁻ et ClO₄⁻, c'est parce que la synthèse, différente de celle de [Ru(bpy)₂(bpy-Si)]Cl₂, fait intervenir dans une première étape des sels AgX et conduit à la précipitation de AgCl, ce qui a pour conséquence de déplacer l'équilibre vers la droite, favorisant ainsi la formation de l'intermédiaire **b'** (Schéma III.4b). L'inconvénient de ces complexes formés par précipitation de sels d'argent est leur manque de solubilité dans l'eau.


 Schéma III.4 – Mécanisme de formation de complexes de type [Ru(pp)₂(pp')]Cl₂ (1) et [Ru(pp)₂(pp')]X₂ avec X = PF₆⁻ et ClO₄⁻ (2)

La spectroscopie de masse par la technique FAB confirme la formule proposée pour ce complexe. Le spectre montre deux pics caractéristiques du complexe, le premier étant $[M+H-HCl]^+$ à $m/z = 852$ et le second correspondant à $[M+2H-2HCl]^{2+}$ à $m/z = 408$. Le profil isotopique théorique est en accord avec celui obtenu expérimentalement. De plus l'analyse élémentaire précise que le complexe précipite avec 2 molécules d'eau.

Le spectre en IR atteste de la structure du complexe $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$. Les valeurs des bandes sont reportées dans le Tableau III.1 aussi bien pour le complexe synthétisé que le précurseur $RuCl_2(bpy)_2$. Les groupements qui permettent de différencier bpy et bpy-Si sont la chaîne propyle et la fonction silane. La chaîne propyle est caractérisée au travers des bandes d'élongation des groupements CH_3 et CH_2 présentes dans la zone $2992-2891\text{ cm}^{-1}$ et des bandes de déformation à 1485 et 1384 cm^{-1} . La signature de la fonction silane est donnée par les bandes très intenses $\nu(Si-C)$ et $\nu(Si-OC_2H_5)$ respectivement à 1237 cm^{-1} et dans la zone de 1160 à 950 cm^{-1} . Les autres bandes sont imputables aux cycles des bipyridines. Les bandes intenses et fines $\nu(C=N)$ apparaissent à 1659 et 1608 cm^{-1} tandis que les bandes $\nu(C=C)$ apparaissent à 1540 , 1457 , 1444 , et 1418 cm^{-1} . Quant aux bandes $\nu(CH)_{ar}$ et $\delta(CH)_{ar}$, elles absorbent à 3079 et 763 cm^{-1} respectivement.

	$RuCl_2(bpy)_2$	$[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$
$\nu(CH)_{ar}$	3066	3079
$\nu_{as}(CH_3)$		2992
$\nu_{as}(CH_2)$		2934
$\nu_s(CH_3)$		2891
$\nu(C=N)$	1630	1659
	1601	1608
$\nu(C=C)$	1560	1540
	1445	1457
	1419	1444
		1418
$\delta_{as}(CH_3), \delta(CH_2)$		1485
$\delta_s(CH_3)$		1384
$\nu(Si-C)$		1237
		1160
$\nu(Si-O-C)$		1066
		950
$\delta(CH)_{ar}$	767	763

Tableau III.1 – Vibrations infra-rouge des complexes $RuCl_2(bpy)_2$ et $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$ (cm^{-1})

Il est important que la fonction éthoxysilane ne soit pas hydrolysée pour éviter toutes les réactions d'homocondensation du complexe. Bien que la spectroscopie IR permette ce

contrôle, la spectroscopie RMN du ^1H est une technique plus puissante permettant de confirmer la structure du complexe. Tous les signaux des protons ont été attribués et sont bien définis. La présence des pics à 1,17 et 3,54 ppm, attribués aux groupements éthoxy, indique que l'hydrolyse de ces fonctions n'a pas eu lieu. Les protons de la chaîne propyle en α , β et γ du silicium résonnent à 0,66 ; 1,67 et 2,65 ppm respectivement. Le proton en α de l'azote apparaît à 3,80 ppm. Le proton de l'amine sort à 3,98 ppm. Les protons des bipyridines sont aussi bien définis, et il est possible de distinguer dans la zone des aromatiques, les bipyridines simples et substitués dans les proportions attendues, comme présenté dans la Figure III.1. Le spectre en ^{13}C confirme l'intégrité du complexe, tous les pics ont été attribués dans la Figure III.2.

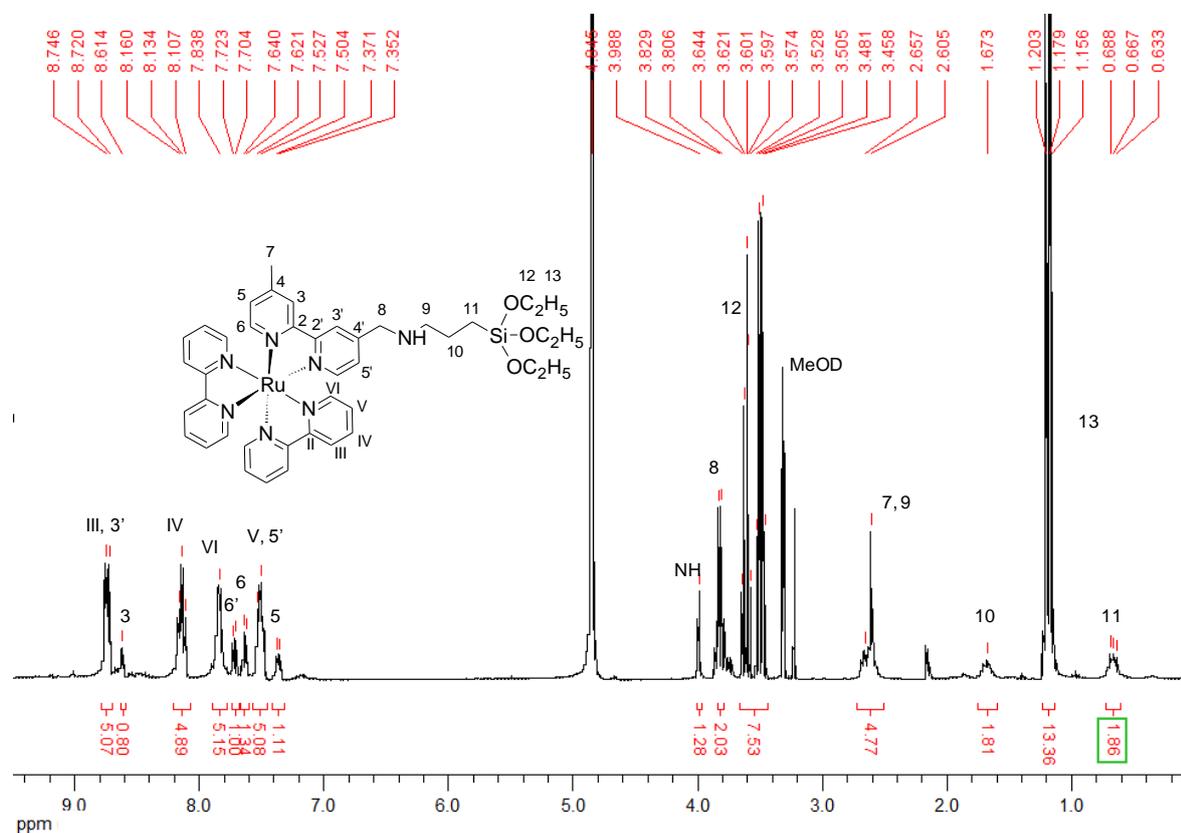
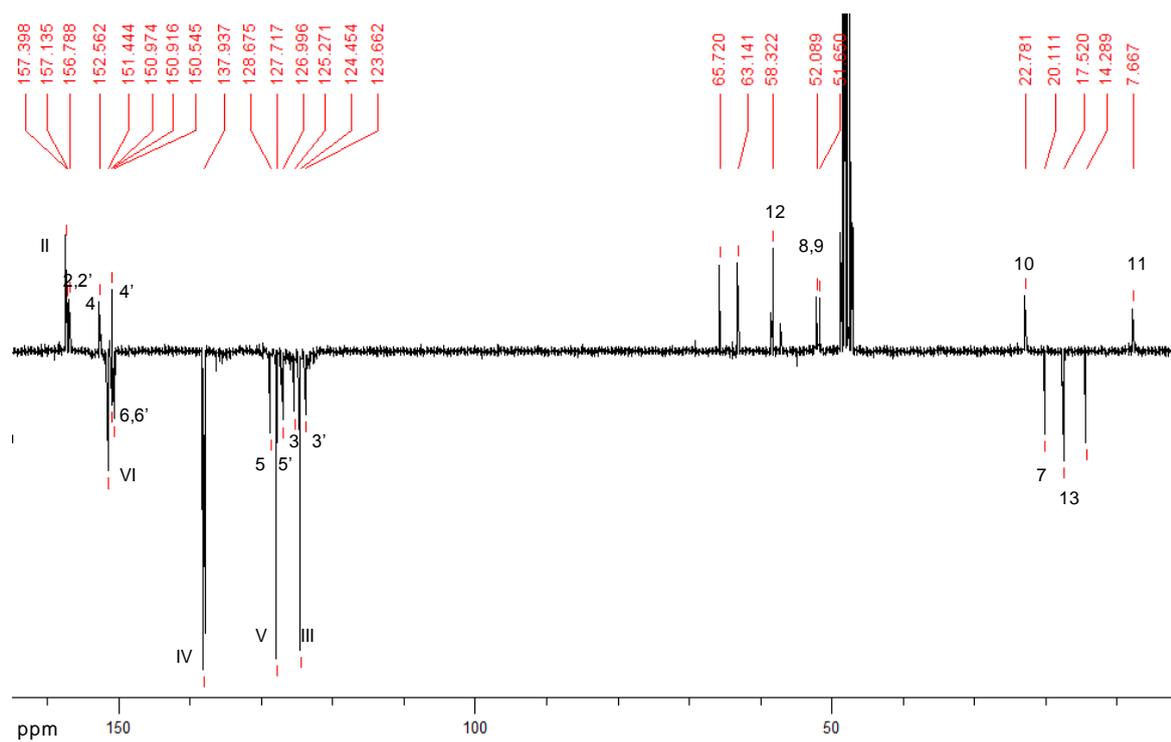
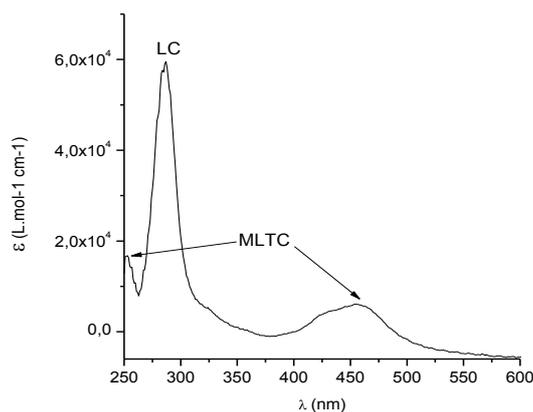


Figure III.1 – Spectre RMN ^1H (300 MHz, MeOD) du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$

Figure III.2 – Spectre $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, MeOD) du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$

Le spectre UV-vis du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ a été enregistré dans l'eau à 25 °C. Comme illustré dans la Figure III.3, le spectre présente une bande très intense à 287 nm ($\epsilon = 59\,350 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) attribuée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand. Les deux bandes restantes à 252 nm ($\epsilon = 16\,750 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et 456 nm ($\epsilon = 5\,900 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ont été attribuées aux transitions de transfert de charge métal-ligand d (Ru) $\rightarrow \pi^*$.

Figure III.3 – Spectre d'adsorption UV-visible de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ dans l'eau à 25 °C

Nous avons enregistré le spectre d'excitation et d'émission du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ en milieu aqueux (Figure III.4a-b). Le spectre d'excitation présente deux maxima à 285 nm et 450 nm correspondant respectivement à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand et au transfert

de charge métal-ligand. Le spectre d'émission présente une large bande qui s'étend de 600 à 775 nm caractéristique des complexes de ruthénium(II).

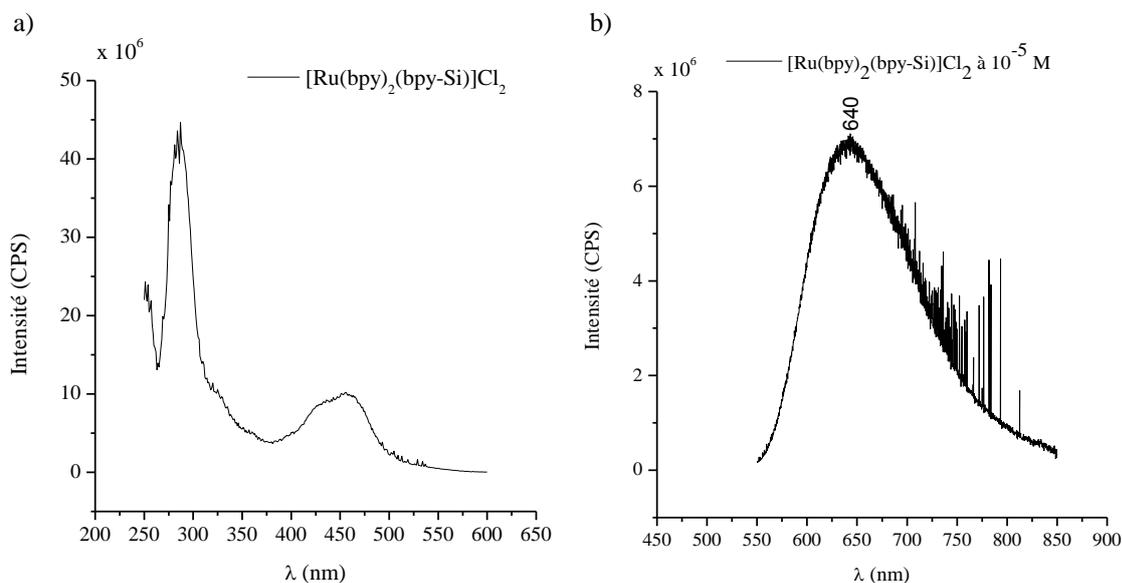


Figure III.4 – a) Spectre d'excitation et b) Spectre d'émission du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})\text{Cl}_2$ à $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$

Le rendement quantique est une caractéristique photo-physique importante des luminophores. Il existe deux méthodes pour la détermination du rendement quantique, la méthode dite absolue et la méthode comparative qui est une méthode de choix pour la détermination du rendement quantique en solution.¹⁴⁰ Elle consiste à comparer l'intensité de luminescence d'un luminophore non connu à celle d'un luminophore de référence dont le rendement quantique est connu. Le luminophore de référence doit avoir des bandes d'absorption et d'émission proches du luminophore à caractériser. Le rendement quantique de l'échantillon est lié à la formule suivante :

$$\Phi_e = \Phi_r \times \frac{A_r}{A_e} \times \frac{F_e}{F_r} \times \frac{(n_e)^2}{(n_r)^2}$$

où les indices e et r correspondent à échantillon et à la référence respectivement, A l'absorbance à une longueur d'onde d'excitation, F l'aire du spectre de luminescence en émission, et n l'indice de réfraction du solvant contenant le matériau. Il faut impérativement travailler avec des absorbances inférieures ou égales à 0,1 pour éviter le photo-quenching du complexe.

Pour déterminer le rendement quantique du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$, nous avons bien évidemment choisi $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ comme référence pour les raisons citées précédemment.¹¹ Il est important de préciser les conditions de mesure du rendement quantique car cette valeur est

¹⁴⁰ Eaton, D. F., *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107-14.

fonction de nombreux paramètres tels que le solvant utilisé, la température ou encore de la présence d'air. A 25°C, dans l'eau en équilibre avec l'air, le rendement quantique de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ est de $0,028 \pm 0,002$ pour une excitation à 436 nm. Nous nous mettons dans ces conditions pour déterminer le rendement quantique de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$.

Le rapport F/A (Figure III.5) des deux complexes $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ et $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ est déterminé en traçant l'aire des spectres d'émission en fonction de l'absorbance des solutions à différentes concentrations comprises entre 10^{-6} et 6.10^{-6} M pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ et entre 2.10^{-6} et 8.10^{-6} M pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$. Ces gammes de concentration sont choisies de telle façon que l'absorbance des deux complexes soit inférieure à 0,1.

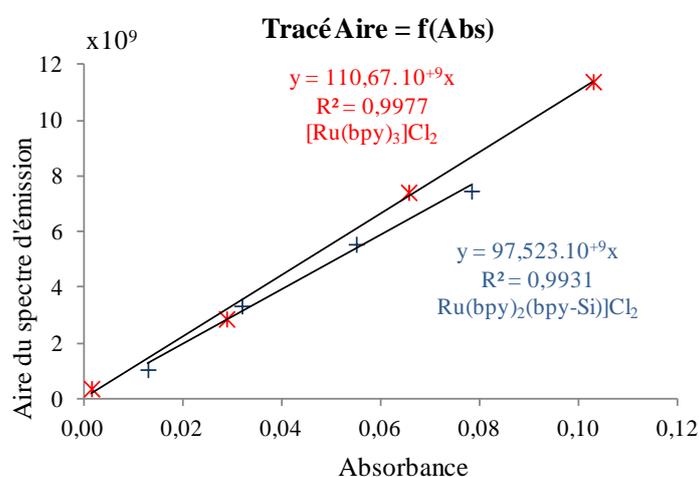


Figure III.5 – Détermination des rapports F/A du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ en rouge et du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ en bleu

Après calcul, nous trouvons un rendement quantique pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ égal à 0,024, proche de celui de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ à 0,028.

1.2. Synthèse et caractérisation de $\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2$

La première approche tentée pour synthétiser $\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2$ était basée sur le protocole de synthèse de $\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2$, c'est-à-dire en faisant réagir $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en présence de 2 équivalents de bpy-Si et un excès de LiCl au reflux du DMF pendant 8 heures. Cependant cette tentative s'est avérée infructueuse. Dans une seconde approche, nous avons entrepris de travailler avec le précurseur $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ ¹²⁸ qui a la particularité de subir facilement des substitutions des ligands DMSO, faiblement coordonnés au centre métallique. $\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2$ est obtenu en faisant réagir 2 équivalents de ligands bpy-Si avec le complexe précurseur au reflux dans l'éthanol pendant 2 heures.¹²⁸ Après concentration du solvant et ajout du mélange

Et₂O/acétone, il se forme un précipité qui est récupéré par filtration. Le complexe, de couleur marron, est obtenu avec un rendement de 77%.

Evans *et al.*¹²⁸ ont montré pour le complexe RuCl₂(DMSO)₄, qu'une fois solubilisé dans un solvant alcoolique, le ligand DMSO O-coordiné et un ligand DMSO S-coordiné en position cis sont substitués par des molécules du solvant. Il s'en suit la complexation d'un premier ligand bpy-Si. Par substitution des deux autres ligands DMSO, nous obtenons le complexe RuCl₂(bpy-Si)₂ (Schéma III.5).

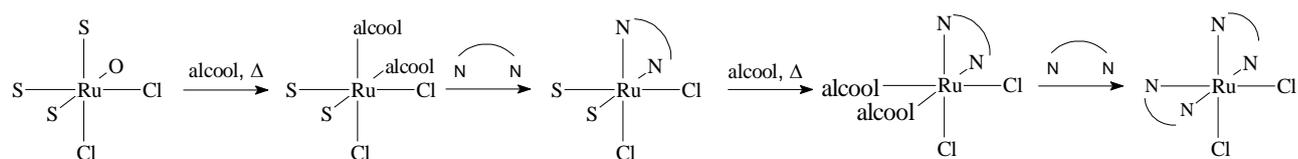


Schéma III.5 – Mécanisme de formation de complexes à partir de RuCl₂(DMSO)₄

La spectroscopie de masse par la technique électrospray confirme la formule proposée pour le complexe. Le pic moléculaire n'est pas détecté mais le spectre présente un pic caractéristique, [M+H-HCl]⁺ à m/z = 943. Le profil isotopique expérimental est en accord avec celui calculé pour la formule RuCl₂(bpy-Si)₂.

En spectroscopie IR, le complexe de RuCl₂(DMSO)₄ présente une signature due aux groupements CH₃ liés à un atome de soufre. Leurs fréquences d'élongation asymétrique et symétrique sont plus élevées (3021 et 2920 cm⁻¹) que lorsque ces groupements sont liés à un atome de carbone. Pour le complexe RuCl₂(bpy-Si)₂ nous pouvons noter l'absence de ces bandes et la présence des bandes dues aux bipyridines et aux fonctions silane. Les vibrations d'élongation et de déformation des groupements CH₃ sont observées à 2972-2885 cm⁻¹. Les bandes caractéristiques des bipyridines (ν(C=N), ν(C=C) et δ(CH)_{ar}) sont présentes dans la zone 1617 - 1420 cm⁻¹ et à 784 cm⁻¹ tandis que les pics caractéristiques de la fonction silane (ν(Si-C) et ν(Si-OC₂H₅)), apparaissent à 1235 et 1166-955 cm⁻¹. Les valeurs sont résumées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2 – Vibrations infra-rouge des complexes $RuCl_2(DMSO)_4$ et $RuCl_2(bpy-Si)_2$ (cm^{-1})

	$RuCl_2(DMSO)_4$	$RuCl_2(bpy-Si)_2$
$\nu_{as}(CH_3)$	3021	2972
$\nu_{as}(CH_2)$		2924
$\nu_s(CH_3)$	2920	2885
$\nu(C=N)$		1617
		1550
$\nu(C=C)$		1479
		1420
	1420	
$\delta_d(CH_3)$	1397	1389
	1310	
$\nu(Si-C)$		1235
$\nu(S=O)$ S-coordonné	1114	
	1086	
		1166
$\nu(Si-O-C)$		1076
		955
$\nu(S=O)$ O-coordonné	937	
$\omega(CH)_{ar}$		784
$\delta_s(CSO)$	425	

Le spectre UV-vis du complexe $RuCl_2(bpy-Si)_2$ a été enregistré dans l'éthanol à 298 K car ce complexe est peu soluble dans l'eau. Le spectre présente une bande très intense à 227 nm ($\epsilon = 20\,450 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) attribuée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand. Les deux bandes restantes à 292 ($\epsilon = 23\,100 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et 472 nm ($\epsilon = 5\,650 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ont été attribuées aux transitions de transfert de charge métal-ligand d (Ru) $\rightarrow \pi^*$.

2. Synthèse de nanoparticules de silice luminescentes par microémulsion inverse

Pour rappel, $Ru(bpy)@Si$ et $Ru(bpy-Si)@Si$ désignent respectivement les nanoparticules de silice encapsulant et incorporant $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ et $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$.

2.1. Protocole de référence

Comme nous l'avons vu dans la bibliographie, la méthode par microémulsion inverse permet d'incorporer les luminophores et notamment $[Ru(bpy)_3]^{2+}$. Il nous a semblé judicieux d'incorporer le complexe de ruthénium(II) silylé jouant le rôle de luminophore, au cœur des nanoparticules de silice pour plusieurs raisons. La silice joue le rôle de matrice protectrice

contre les agents extérieurs et nous gardons la possibilité de fonctionnaliser la surface des nanoparticules et d'en faire des nanoparticules bifonctionnelles, apportant ainsi de nouvelles propriétés aux nanoparticules de départ.

Nous avons utilisé le protocole décrit par Lian *et al.*⁶⁵ dans lequel les auteurs encapsulent $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ dans des particules de silice d'environ 70 nm. Il s'agit d'une microémulsion inverse, obtenue après solubilisation du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ dans l'eau puis ajout de cette solution aqueuse au mélange cyclohexane/hexanol/triton X-100. Après 15 minutes d'agitation, le TEOS est introduit goutte à goutte dans la microémulsion. Pour permettre au TEOS de se répartir dans toute la microémulsion, l'ammoniaque est introduite 15 minutes après. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Les quantités des réactifs sont données dans le Tableau III.3. La microémulsion est déstabilisée par addition d'acétone, puis les nanoparticules sont récupérées par centrifugation et lavées à l'eau, l'éthanol, l'acétone et le diéthyléther. Ensuite les nanoparticules sont séchées sous vide pendant 2 heures minimum, cette étape parfait la synthèse des nanoparticules.

Tableau III.3 – Protocole adopté pour la synthèse de nanoparticules de silice luminescentes

Ordre	Réactifs	Quantité
1	Cyclohexane	60 mL
2	Hexanol	14,4 mL
3	Triton X-100	14 mL
4	H ₂ O	4 mL
4	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$	60 mg
5	TEOS	0,8 mL
6	NH ₄ OH à 28-30% en masse	480 µL

Dans ce protocole, le rapport molaire (**H**) eau/triton X-100 est égal à 10 et le rapport molaire hexanol/triton X-100 (**R**) est égal à 5. Nous avons obtenu des nanoparticules sphériques de 48 nm et monodisperses en taille, avec un rendement de 96%. Cependant bien que les conditions expérimentales soient identiques, la taille des nanoparticules que nous avons obtenues avec $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ diffère de celle obtenue par Lian *et al.*⁶⁵ avec $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$. Nous attribuons cette différence de taille significative (20 nm) à la nature différente des deux complexes, due à la fonction silane. La Figure III.6 présente des clichés MET et MEB des nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ avec l'histogramme correspondant.

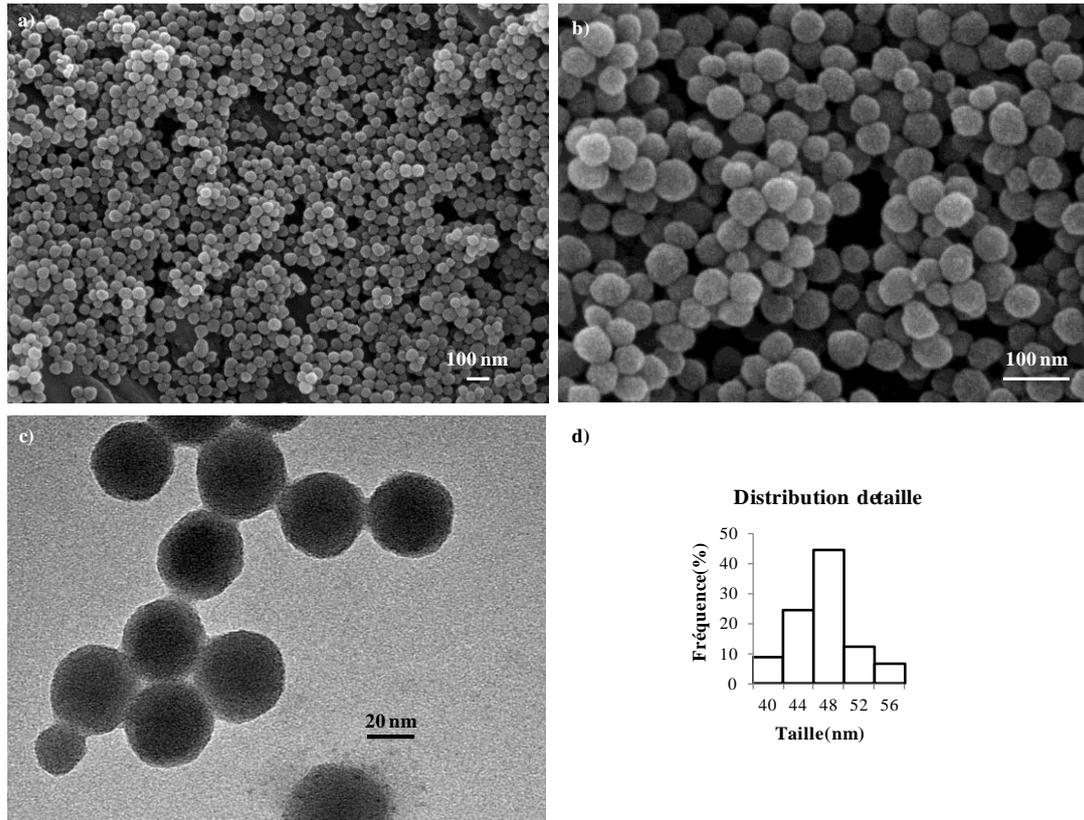


Figure III.6 – a-b) Clichés MEB à différents grossissements ; c) cliché MET ; d) histogramme des particules Ru(bpy-Si)@Si obtenues par microémulsion inverse selon le protocole de Lian et al.⁶⁵

2.2. Synthèse de nanoparticules de silice luminescentes de tailles variées

Afin d'obtenir des nanoparticules de taille variée, nous avons modifié certains paramètres de la microémulsion quaternaire puis réalisé la synthèse par une microémulsion ternaire.

2.2.1. Système quaternaire

A partir du protocole de référence, nous avons fait varier les paramètres suivants: rapports (**H**) et (**R**), mode d'introduction du TEOS.

➤ Le rapport molaire eau/triton X-100 (**H**)

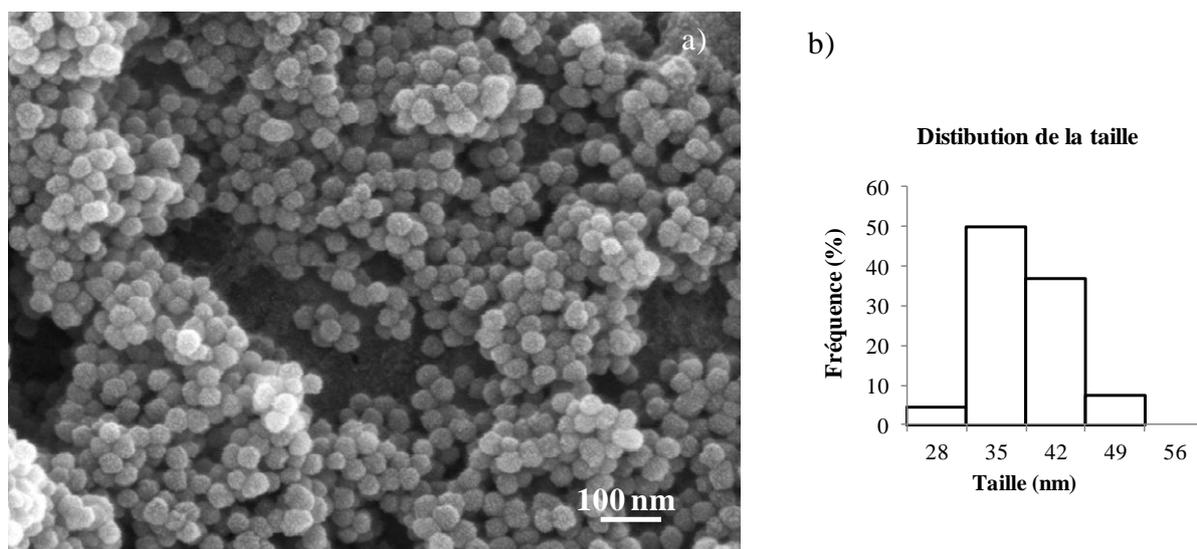
Nous avons réalisé deux expériences où nous avons diminué de moitié et doublé la valeur de **H** par rapport au protocole de référence, tous les autres paramètres restant inchangés, en particulier le rapport **R**. Pour des valeurs de **H** inférieures à 5, la microémulsion est turbide.

Lorsque **H** est égal à 20, la taille des nanoparticules est diminuée (38 nm) comparée à celle obtenue quand **H** = 10 (48 nm). Cependant ces particules restent bien définies, sphériques et monodisperses en taille, comme indiqué sur le cliché MEB (Figure III.7). En diminuant **H** =

10 à 5, la taille moyenne des nanoparticules ne varie pas. Les tailles et les variances correspondantes sont reportées dans le Tableau III.4.

Tableau III.4 – Effet du rapport H sur la taille des particules avec $R = 5$

H	5	10	20
Taille (nm)	48 ± 5	48 ± 5	38 ± 6

Figure III.7 – a) Cliché MEB et b) histogramme de $Ru(bpy-Si)@Si$ quand $H = 20$ et $R = 5$

Kumar *et al.*¹⁴⁴ ont étudié le système quaternaire cyclohexane/triton X-100/hexanol/eau (donc sans le luminophore), et ont montré que pour $H = 5,6$ toutes les molécules d'eau étaient liées à la tête polaire du triton X-100 par des liaisons hydrogène entraînant donc une compétition entre l'hydrolyse du TEOS et la fixation aux têtes polaires. Au-delà de cette valeur, bien qu'une partie des molécules d'eau restent liées au triton X-100, d'autres molécules sont disponibles pour hydrolyser le TEOS conduisant à la formation d'un plus grand nombre de nucléi.⁹⁴ Plus le nombre de nucléi est grand et plus les particules sont petites. Ceci explique que l'augmentation de la valeur H conduit à une diminution de la taille des particules. Arriagada *et al.*¹⁴² indiquent aussi que l'augmentation de H conduit à l'augmentation de la taille des gouttelettes ce qui a pour effet de rendre la micelle moins rigide, du fait de l'écartement des chaînes hydrophobes des surfactants. Cette rigidité moindre favorise les échanges inter-micellaires, et donc la formation d'un plus grand nombre de nucléi. Ces deux phénomènes expliquent l'obtention de particules de plus petites tailles quand le rapport H augmente.

¹⁴¹ Kumar, C.; Balasubramanian, D., *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *74*, 64-70.

¹⁴² Arriagada, F. J.; Osseo-Asare, K., *Colloids Surf., A* **1999**, *154*, 311-326.

Bagwe *et al.*⁹⁴ ont étudié le même système de microémulsion mais incorporant le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$. Quand **H** varie de 5 à 20, la taille des nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy})@\text{Si}$ décroît progressivement de 178 ± 29 nm à 69 ± 4 nm. Nos résultats suivent cette tendance mais bien qu'en travaillant dans des conditions très proches (Tableau III.5), la taille de nos nanoparticules (de 48 ± 5 à 38 ± 5 nm) diffère complètement. Les légères différences des conditions expérimentales ne peuvent pas expliquer à elles seules cette différence ni même la teneur en complexe. Le seul point qui diffère de façon significative est la présence d'une fonction triéthoxysilane dans le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$.

Tableau III.5 – Comparaison du protocole de référence avec celui de Bagwe *et al.*⁹⁴

Protocole	cyclohexane	hexanol	TX-100	H ₂ O	Complexe	TEOS	NH ₄ OH 28%
Référence	60 mL	14,4 mL	14 mL	4 mL	68 mM	0,8 mL	480 µL
Bagwe	60 mL	12,8 mL	13,2 mL	3,84 mL	8 mM	0,8 mL	480 µL



➤ Le rapport hexanol/triton X-100 (**R**)

Nous avons réalisé deux expériences dans lesquelles **R** = 1 et 10, rappelons que dans le protocole de référence **R** = 5. Tous les autres paramètres restent inchangés, en particulier le rapport **H**. Il n'est pas possible de réaliser des synthèses pour des valeurs inférieures à 1 car à partir de cette valeur la microémulsion est déstabilisée.

La taille des nanoparticules obtenues est indiquée dans le Tableau III.6. Elles sont bien définies et monodisperses en taille (Figure III.8). Une diminution de **R** = 5 à **R** = 1 n'affecte pas la taille des particules. En passant de **R** = 5 à 10, la taille des nanoparticules augmente de 48 ± 5 nm à 68 ± 2 nm. Ce dernier résultat est plutôt surprenant puisque dans la bibliographie, c'est l'effet inverse qui est reporté.^{94,143} En effet, l'augmentation de la quantité de co-surfactant diminue la tension interfaciale ce qui augmente la fluidité du film à l'interface eau/huile. Ces changements de la micelle devraient favoriser les échanges inter-micellaires rendant ainsi les particules plus petites.^{94,143}

Tableau III.6 – Effet du rapport **R** sur la taille des particules avec **H** = 10

R	1	5	10
Taille (nm)	48 ± 5	48 ± 5	68 ± 2

¹⁴³ Curri, M. L.; Agostiano, A.; Manna, L.; Monica, M. D.; Catalano, M.; Chiavarone, L.; Spagnolo, V.; Lugarà, M., *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8391-8397.

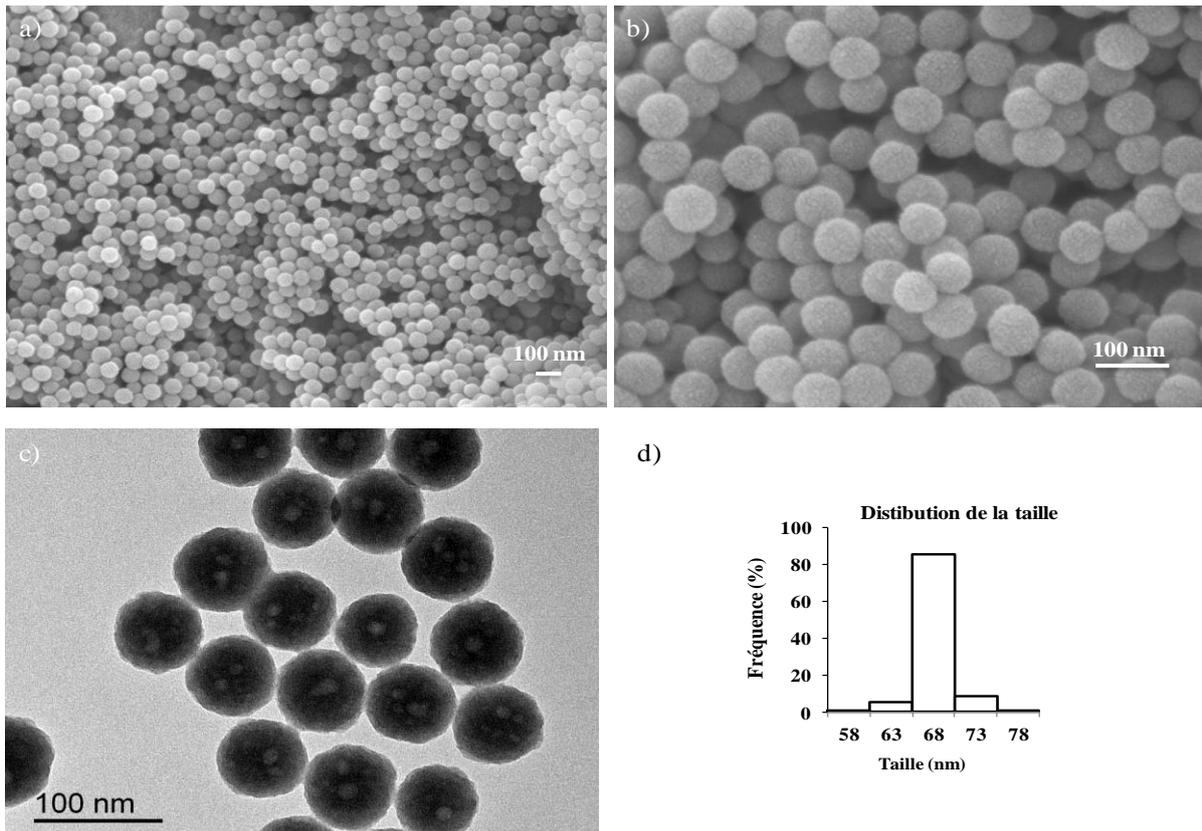
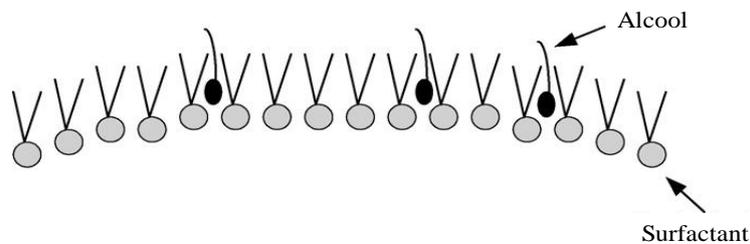


Figure III.8 – a-b) Clichés MEB à différents grossissements ; c) cliché MET ; d) histogramme de $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ quand $R = 10$ et $H = 10$

Une piste est donnée par Nazario *et al.*¹⁴⁴, qui ont montré que dans le système isooctane/AOT/alcool/eau, lorsque les co-surfactants sont des alcools linéaires à longues chaînes ($n \geq 6$), une augmentation de la rigidité de l'interface apparaît car l'alcool se solubilise dans la région hydrophobe des surfactants. Cette configuration pousse les têtes polaires les unes contre les autres rendant la structure plus rigide et plus le nombre de co-surfactant est grand et plus l'interface est rigide (Schéma III.6). L'augmentation de la rigidité de la micelle empêche les échanges inter-micellaires, ce qui entraîne une augmentation de la taille des particules.



¹⁴⁴ Nazário, L. M. M.; Hatton, T. A.; Crespo, J. P. S. G., *Langmuir* **1996**, *12*, 6326-6335.

➤ Mode d'introduction du TEOS

Pour obtenir des particules plus grosses, nous avons tenté de faire une couche de silice à la surface des particules déjà formées de 68 nm par deux protocoles. Le premier protocole consiste à faire la microémulsion de référence puis après les 24 heures d'agitation, et avant la déstabilisation, on rajoute 0,2 mL de TEOS, le mélange est agité 24 heures supplémentaires.^{145,146} Nous n'avons pas observé de variation de la taille des particules. Cependant sur le cliché MEB (Figure III.9), on voit bien que l'échantillon est hétérogène. A certains endroits, on retrouve les nanoparticules sphériques et indépendantes de taille initiale (68 nm) ; à d'autres endroits, le TEOS s'est polymérisé en englobant plusieurs particules à la fois, constituant ainsi des plaques de particules engluées dans la silice.

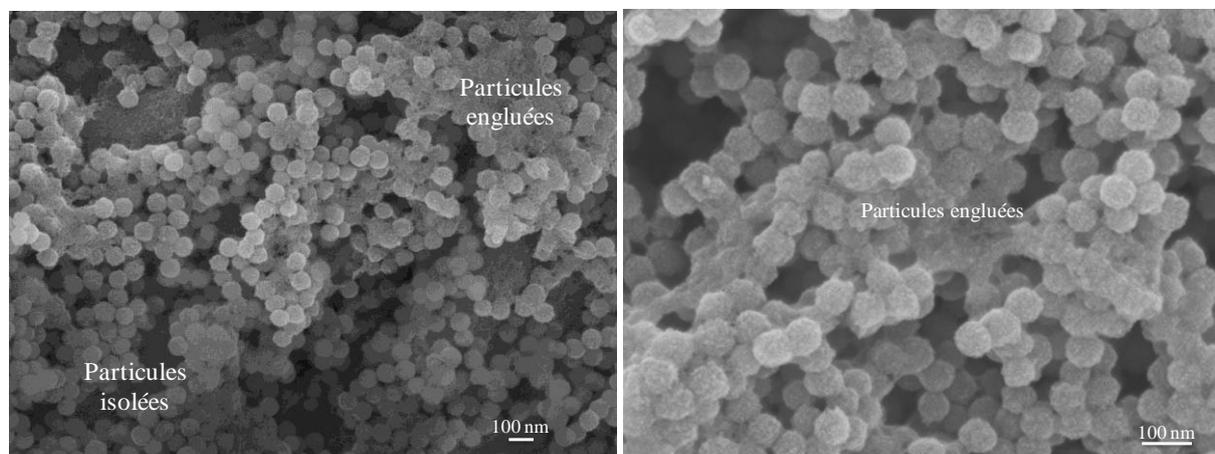


Figure III.9 – Cliché MEB des particules obtenues après rajout de TEOS

Le second protocole est identique au premier à ceci près que de l'ammoniaque est ajoutée juste après le TEOS pour catalyser sa condensation sur les nanoparticules de silice.¹⁴⁷ L'observation des clichés MEB conduit aux mêmes conclusions que dans le premier protocole.

2.2.2. Système ternaire

Afin d'avoir des particules de taille inférieure à 38 nm, nous avons adapté le protocole décrit par Jin *et al.*⁹⁵ dans lequel est incorporé le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ à l'aide d'une microémulsion ternaire composée de cyclohexane/NP-5/eau. Dans ce protocole, les auteurs réalisent aussi la fonctionnalisation des particules dans une dernière étape par réaction de co-condensation en introduisant du TEOS et du N-(triméthoxysilylpropyl)éthylènediamine

¹⁴⁵ Fu, X.; Qutubuddin, S., *Colloids Surf., A* **2001**, 179, 65-70.

¹⁴⁶ Hartlen, K. D.; Athanasopoulos, A. P. T.; Kitaev, V., *Langmuir* **2008**, 24, 1714-1720.

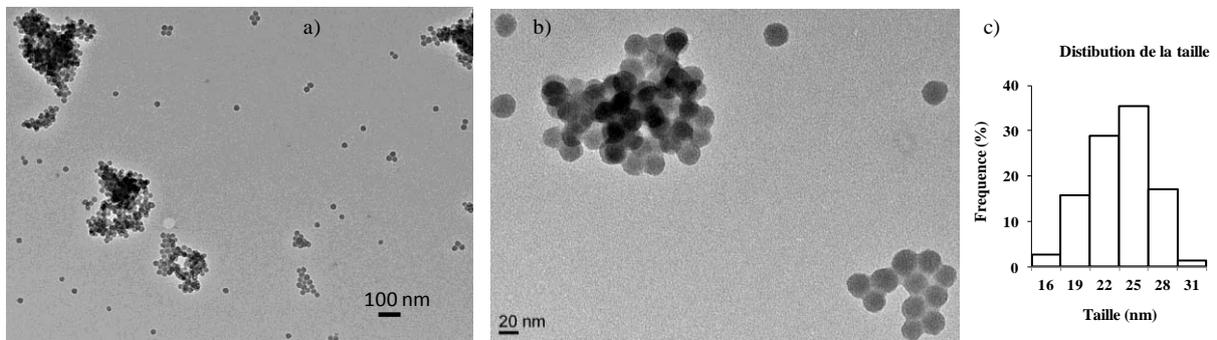
¹⁴⁷ Guo, J.; Liu, X.; Cheng, Y.; Li, Y.; Xu, G.; Cui, P., *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, 326, 138-142.

triacétate de sodium (Tableau III.7). Rappelons que notre objectif est d'obtenir des nanoparticules luminescentes fonctionnalisées en surface par une monocouche d'organosilane. Or la méthode de fonctionnalisation utilisée par Jin *et al.*⁹⁵ ne répond pas à ce critère. En effet, la fonctionnalisation se fait en milieu aqueux et de surcroît en présence d'ammoniaque, ce qui favorise les réactions d'homo-condensation des organosilanes par rapport au greffage. Ainsi nous n'avons pas réalisé la dernière étape décrite dans le protocole de Jin *et al.*⁹⁵ (Tableau III.7).

Tableau III.7 – Conditions opératoires pour la synthèse de nanoparticules à partir de la microémulsion ternaire

Ordre	Réactifs	Protocole de Jin ⁹⁵	Protocole appliqué
1	Cyclohexane	10 mL	10 mL
2	NP-5	0,46 mL	0,5 mL
3	H ₂ O	90 µL	90 µL
3	Complexe de Ruthénium	1,70 mM	27 mM
4	TEOS	80 µL	80 µL
5	NH ₄ OH à 28-32% en masse	60 µL	60 µL
6	TEOS	20 µL	-
7	Organosilane	20 µL	-

Comme présenté dans la Figure III.10, nous obtenons des nanoparticules monodisperses de 25 ± 5 nm. La différence de taille des particules obtenues par microémulsion quaternaire et ternaire est principalement due à la nature du surfactant utilisé.⁹⁵



En faisant varier les rapports eau/surfactant et co-surfactant/surfactant, nous avons synthétisé des particules de 38, 48 et 68 nm qui sont parfaitement sphériques et monodisperses en taille. En utilisant la microémulsion ternaire, des particules de plus petite taille sont obtenues (25 nm).

2.3. Caractérisations des nanoparticules de silice luminescentes

2.3.1. Détermination des taux d'incorporation de $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$

Le taux d'incorporation de $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$, τ_{Ru} exprimé en mmol de complexe par gramme de silice dans les nanoparticules est déterminé par analyse élémentaire (AE) et par analyse thermogravimétrique (ATG).

L'azote est l'élément le plus fiable pour quantifier le taux d'incorporation du complexe. C'est avec la relation ci-dessous que nous avons calculé τ_{Ru} .

$$\tau_{Ru} = \frac{\%N \times 10^3}{100 \times 14 \times n_N} \quad \begin{array}{l} \%N \text{ étant le pourcentage massique en azote} \\ n_N \text{ étant le nombre d'atomes d'azote dans le complexe.} \end{array}$$

Les taux d'incorporation sont de 0,09 mmol.g⁻¹ pour les particules de 25 et de 0,21 mmol.g⁻¹ pour celles de 38, 48 et 68 nm. A partir des taux d'incorporation obtenus avec l'azote, nous avons calculé les pourcentages massiques attendus pour le carbone et l'hydrogène, et comparé avec les valeurs expérimentales. Cette comparaison permet de révéler la présence de triton X-100 résiduel comme mentionné dans les travaux de thèse de S. Cousinié.¹⁴⁸ Après plusieurs lavages, il reste des traces de triton X-100, cependant des lavages supplémentaires avec l'acétone conduisent à une meilleure solubilisation du triton X-100 passant de 0,08 à 0,02 mmol.g⁻¹ de triton X-100.

Nous avons réalisé l'analyse thermogravimétrique des nanoparticules de 38, 48 et 68 nm. Quelle que soit la taille, l'allure des courbes est identique. La première perte de masse (Δm_1) comprise entre 90 à 120°C, correspond à la déshydratation de silice. La seconde perte de masse (Δm_2) correspond à la décomposition du complexe qui commence à 290°C et se termine à 900°C. Le taux d'incorporation est déterminé par la formule suivante.

$$\tau_{Ru} = \frac{\Delta m_2 \times 10^3}{m_{ech} \times M_{cx}} \quad \begin{array}{l} m_{ech} \text{ est la masse de départ et } M_{cx} \text{ est la masse molaire du complexe} \\ \text{sans la fonction alkoxy-silane.} \end{array}$$

Les taux ainsi déterminés sont de 0,24 ; 0,19 et 0,23 mmol.g⁻¹ pour les nanoparticules de 38, 48 et 68 nm respectivement globalement en accord avec les taux d'incorporation calculés par analyse élémentaire.

¹⁴⁸ Thèse de Sandra Cousinié, Nanoluminophores inorganiques – Greffage de complexes de ruthénium(II) et d'euporium(III) sur nanoparticules de silice, Université de Toulouse, soutenue en 2007.

2.3.2. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules luminescentes à l'état solide

La spectroscopie infrarouge utilisant la technique de réflexion diffuse (DRIFT) est un outil très utile pour l'identification des différents groupements fonctionnels et est adapté à l'analyse des surfaces des matériaux. Les groupements silanol à la surface de la silice sont identifiés par une bande d'élongation à 3636 cm^{-1} . Les bandes caractéristiques de la silice apparaissent à 1195 et 1096 cm^{-1} et sont attribuées aux vibrations d'élongation Si-O et 957 et 806 cm^{-1} , attribuées aux vibrations de déformation Si-O. Les bandes de la bipyridine sont très caractéristiques de nos nanoparticules et sont présentes à 1617 et à $1560-1466\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux bandes de vibrations des groupements C=N et C=C respectivement. L'intégrité chimique du luminophore est confirmée par la RMN du ^{13}C . Les pics aromatiques des ligands bipyridine apparaissent à 124 , 127 , 138 , 151 et 157 ppm , attribués aux carbones C_{III} , C_{V} , C_{IV} , C_{VI} et C_{II} respectivement. Les pics de la chaîne propyle du ligand bpy-Si apparaissent à $10,4$; $21,5$ et $43,0\text{ ppm}$ (Figure III.11a).

La technique de RMN CP MAS du ^{29}Si donne des informations sur l'environnement de l'atome de silicium. Quelle que soit la taille des nanoparticules de silice, le spectre des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si montre trois pics caractéristiques de la silice Q^2 , Q^3 et Q^4 à -92 , -101 et -110 ppm respectivement comme reporté dans la bibliographie.^{117,118,149} La présence du complexe est révélée par un pic T^3 à -67 ppm indiquant une condensation totale des alcoxysilanes sur la silice (Figure III.11b).

La technique CP MAS est une technique amplifiant le signal Q^3 par rapport à Q^4 , ce qui ne permet pas une analyse quantitative des groupements silanol présents à la surface des nanoparticules. La spectroscopie RMN MAS du ^{29}Si , ne faisant pas de transfert de polarisation de système spins-noyau abondants (^1H) vers un système spins-noyau (^{29}Si) rare va permettre de quantifier les groupements silanol à la surface des particules. La déconvolution des pics Q^3 et Q^4 donne un rapport de $45/55$, ce qui montre que la surface des nanoparticules de silice obtenues par microémulsion inverse est fortement hydroxylée, ce qui va permettre de réaliser des réactions de greffage.

¹⁴⁹ de Monredon, S.; Pottier, A.; Maquet, J.; Babonneau, F.; Sanchez, C., *New J. Chem.* **2006**, *30*, 797-802.

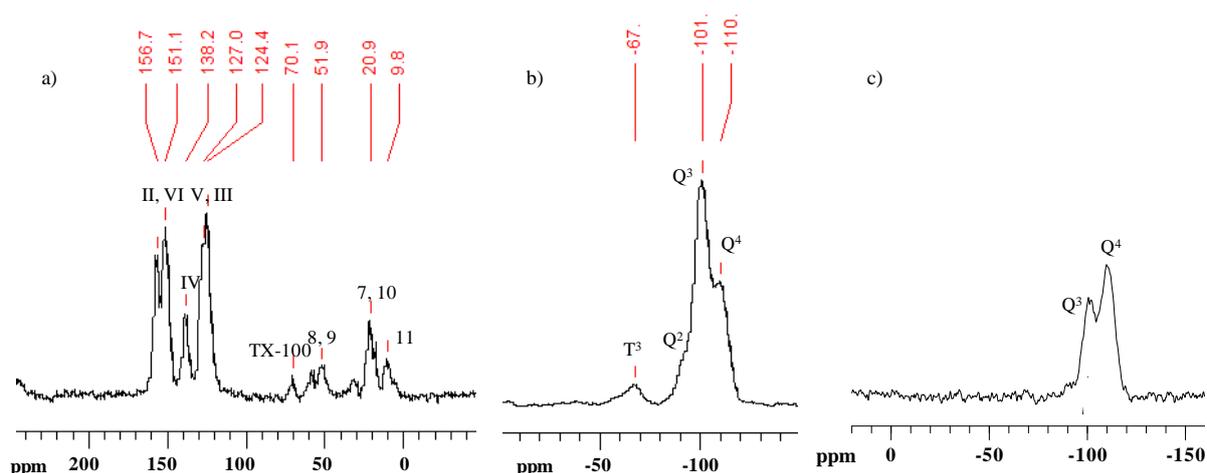


Figure III.11 – a) Spectre CP MAS du ^{13}C (100,4 MHz) des particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$; b-c) Spectres CP MAS et MAS du ^{29}Si (79 MHz) des particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$

L'analyse XPS permet la caractérisation physico-chimique en surface des nanoparticules luminescentes. Les mesures ont été réalisées sur les nanoparticules de 48 nm. Le spectre général des particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ permet d'identifier les différents éléments présents à l'aide des signaux Si 2p, Si 2s, Ru 3d, C 1s, N 1s, Ru 3p et O 1s (Figure III.12a).

✓ Déconvolution des signaux présents

La déconvolution des signaux permet une analyse fine de l'environnement chimique des éléments constitutifs. Les figures III.9b, III.9c, III.9e et III.9f concernent respectivement les éléments Si, N, O et C et Ru. Le signal Si 2p est constitué de deux composantes (Figure III.12b). La première composante dont l'énergie de liaison est de 101,7 eV est générée par C- SiO_x ¹⁵⁰ qui indique que le complexe, via la fonction silane, s'est condensé sur la silice. La deuxième composante à 103,4 eV englobe le signal de la silice SiO_2 et des silanols $\text{Si}(\text{O})_{2-x}(\text{OH})_{4-2x}$, en accord avec des études réalisées par Raquèz *et al.*¹⁵¹ sur du talc. Le pic de l'élément azote N 1s est déconvolué également en deux pics (Figure III.12c). Les populations présentes aux énergies de liaisons de 398,5 et 400,1 eV sont respectivement les groupements $-\text{NH}$ et $-\text{C}=\text{N}=\text{C}$.^{152,153} Le pic de l'élément oxygène O 1s se décompose en deux pics à 531,4 et 532,7 eV correspondant à Si-OH ¹⁵⁴ et SiO_2 ¹⁵⁵ (Figure III.12d). Nous pouvons noter que la déconvolution du pic de l'oxygène permet de différencier le signal de la silice des silanols

¹⁵⁰ Parvole, J.; Laruelle, G.; Khoukh, A.; Billon, L., *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 372-382.

¹⁵¹ Raquez, J. M.; Nabar, Y.; Narayan, R.; Dubois, P., *Macromol. Mater. Eng.* **2008**, *293*, 310-320.

¹⁵² Perruchot, C.; Chehimi, M. M.; Delamar, M.; Fievet, F., *Surf. Interface Anal.* **1998**, *26*, 689-698.

¹⁵³ Yu, Y.; Zhou, M.; Cui, H., *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12622-12625.

¹⁵⁴ Graubner, V.-M.; Jordan, R.; Nuyken, O.; Schnyder, B.; Lippert, T.; Koetz, R.; Wokaun, A., *Macromolecules* **2004**, *37*, 5936-5943.

¹⁵⁵ Lassaletta, G.; Fernandez, A.; Espinos, J. P.; Gonzalez-Eliphe, A. R., *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1484-90.

contrairement au signal sous Si 2p. Les signaux des éléments carbone 1s et ruthénium 3d se chevauchent (Figure III.12e) mais ceci ne pose pas de problème pour l'interprétation. En effet le signal de Ru 3d se décompose en deux composantes, Ru 3d 5/2 et Ru 3d 3/2 dont les énergies de liaison sont de 281,2 eV et 285,3 eV respectivement. La première composante Ru 3d 5/2 est facile à repérer mais la seconde l'est moins. Il faut savoir que d'un point de vue intrinsèque, la composante Ru 3d 3/2 est toujours positionnée à une distance de + 4,1 eV et que son intensité représente 75% de la composante Ru 3d 5/2.¹⁵⁶ A partir de ces informations, nous parvenons à tracer la composante Ru 3d 3/2. Ces deux composantes sont dues au ruthénium complexé à la bipyridine (RuC₅N)₆.¹⁵⁷ Comme attendu les composantes C-H, C-C et C-N du complexe sont présentes. Cependant l'interprétation du pic carbone doit être faite avec précaution du fait d'une couche de pollution carbone, toujours présente dans l'échantillon. En effet de par la nature de nos échantillons, sous forme de poudre, aucun décapage n'est envisageable. Ainsi le spectre présente les pics C-O et C=O attribués à la couche de pollution ainsi qu'une exaltation des groupements C-C et C-H.

¹⁵⁶ Moulder, J.F.; Stickle, W.F.; Sobol, P.E.; Bomben, K.D., Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy, Ed. J. Chastain, Perkin-Elmer Corporation, Eden Prairie, Minnesota, USA, **1992**.

¹⁵⁷ Auburn, P. R.; Dodsworth, E. S.; Haga, M.; Liu, W.; Nevin, W. A.; Lever, A. B. P., *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3502-12.

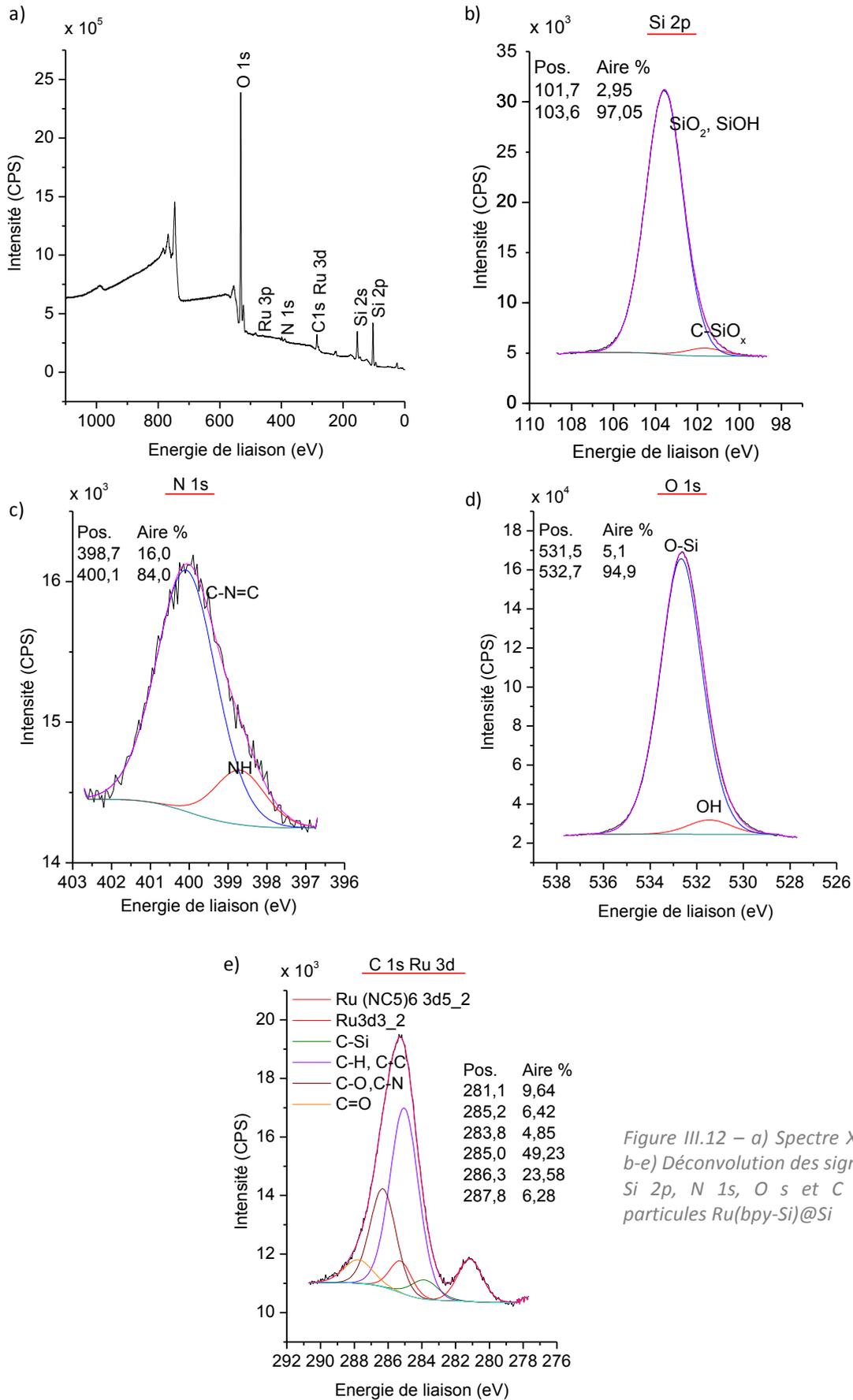


Figure III.12 – a) Spectre XPS général et b-e) Déconvolution des signaux Si 2p, N 1s, O 1s et C 1s Ru 3d des particules Ru(bpy-Si)@Si

Il est important de noter que le pic Cl 2p n'apparaît pas sur le spectre général (Figure III.12a), même après plusieurs balayages aux environs de 200 eV, zone de détection du pic Cl 2p. L'absence des contre-ions chlorure s'explique par le fait que lors de la synthèse ces ions ne sont pas incorporés dans la matrice de silice, elle-même globalement chargée négativement.

✓ Analyse semi-quantificative

La spectroscopie XPS est une analyse semi-quantitative permettant de déterminer la composition de l'extrême surface d'un matériau. Les rapports atomiques mesurés et calculés (à partir des taux d'incorporation en AE du complexe τ_{Ru}) sont indiqués dans le Tableau III.8. Le rapport N/Ru mesuré de 6,6 est en accord avec la formule du complexe, constitué de 7 atomes d'azote pour un atome de ruthénium, montrant ainsi que son intégrité chimique a bien été conservée. Par contre le rapport Si/Ru mesuré de 206 est plus élevé que celui attendu (80). Ce résultat montre que l'extrême surface des nanoparticules est moins riche en complexe que ne l'est le reste des particules. En considérant, la profondeur d'analyse par la spectroscopie XPS, qui est de l'ordre de 3 nm, et le fait le rapport N/Ru soit correct, l'explication la plus probable de cette divergence est la présence d'une couche riche en silice. Ces conclusions sont en accord avec la méthode d'incorporation des nanoparticules de silice.

	Rapport atomique		
	O/Si	N/Ru	Si/Ru
^a Calculé	1,9	7,0	80
Mesuré	1,8	6,6	206

^a valeur calculée à partir des taux d'incorporation

Tableau III.8 – Rapports atomiques calculés et mesurés pour les particules Ru(bpy-Si)@Si

Les surfaces spécifiques ont été calculées pour les nanoparticules de silice luminescentes, à partir des isothermes d'adsorption en utilisant le modèle BET. La mesure consiste à estimer la quantité d'azote pouvant s'adsorber à la surface des matériaux. Les valeurs des surfaces spécifiques sont comprises entre 161 et 49 m².g⁻¹ respectivement pour les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si de 68 et 25 nm.

2.3.3. Evaluation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en solution

Pour l'application que nous visons (exploration des biofilms *in situ*), nous serons amenés à utiliser les particules en solution aqueuse, il est donc important de connaître la taille des particules en solution. Pour cela nous avons fait appel à la technique de DLS qui permet de

connaître le diamètre hydrodynamique des particules étudiées mais également permet de se rendre compte si le système étudié présente des agrégats en solution.

Cependant nous n'avons pas mesuré le diamètre hydrodynamique exact des particules car la luminescence du complexe a perturbé la mesure. En effet, le complexe de ruthénium émet de 550 à 800 nm (avec un maximum d'émission à 640 nm) et nous disposons d'un appareil Nanosizer uniquement équipé d'un laser 633 nm. Afin d'évaluer indirectement la taille des particules en solution, nous avons fait les mesures sur des nanoparticules de silice ne contenant pas le complexe. Ces particules ont été synthétisées dans les mêmes conditions que les particules Ru(bpy-Si)@Si et nous nous sommes assurés par des clichés TEM que la taille des particules sans complexe était similaire à leurs homologues incorporant le complexe. Le Tableau III.9 reporte la taille des particules mesurée par TEM ainsi que le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS. Le diamètre hydrodynamique des particules de silice seule est un peu plus grand (entre 4 et 10 nm) que les tailles mesurées par TEM. Nous pouvons supposer que les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si sont aussi majorés de ces mêmes valeurs par rapport à leur taille à l'état solide. Dans le cas des particules de 20 nm, deux populations sont observées de 160 nm et 570 nm, montrant que ces particules forment des agrégats en solution.

Diamètre de Ru(bpy-Si)@Si (nm)	25 ± 5	48 ± 5	38 ± 5	68 ± 2
Diamètre de SiO ₂ (nm)	20 ± 5	45 ± 5	36 ± 5	62 ± 2
Diamètre Hydrodynamique de SiO ₂ (nm)	-	53 ± 7	46 ± 13	66 ± 10

Tableau III.9 – Détermination de la taille (MET) et du diamètre hydrodynamique (DLS) des nanoparticules de silice

3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice luminescentes

Pour rappel, les nanoparticules fonctionnalisées par greffage sont notées Ru(bpy-Si)@Si-X où X est le groupement fonctionnel de l'organosilane greffé à la surface de la silice.

Pour des raisons décrites dans le chapitre bibliographique, nous avons choisi de fonctionnaliser la surface des nanoparticules de silice avec les six organosilanes présentés dans le Schéma III.7.

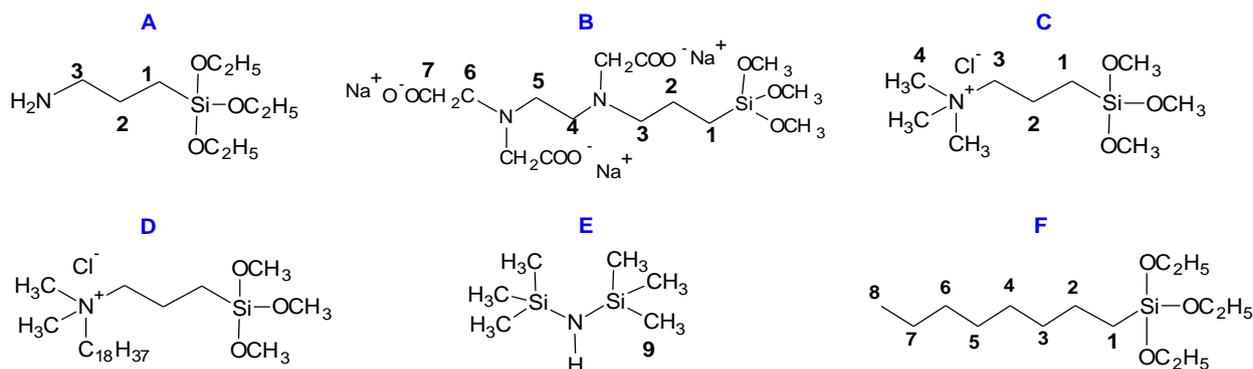


Schéma III.7 – Formules développées des organosilanes utilisés pour le greffage des nanoparticules

3.1. Greffage en milieu anhydre des organosilanes sur les particules de silice luminescentes

Rappelons que nous souhaitons obtenir une monocouche d'organosilane à la surface des nanoparticules, pour cela nous avons travaillé dans des conditions anhydres de greffage. Pour cela nous avons utilisé un solvant organique qui permet aussi une bonne solubilité des organosilanes. Dans le but d'éliminer toute trace d'eau physisorbée les nanoparticules sont chauffées à 80 °C sous vide avant la réaction de greffage. La réaction est réalisée dans de l'acétonitrile anhydre au reflux (81 °C) pendant 24 heures en introduisant 2 mmol d'organosilane par gramme de silice (Ω).

Nous avons greffé les six organosilanes sur les nanoparticules de 25 et 68 nm de diamètre, celles de 48 nm ont été greffées par cinq organosilanes (**A**, **B**, **C**, **E** et **F**). Nous avons ainsi obtenu dix-sept sortes de nanoparticules bifonctionnelles. Dans le Tableau III.10 sont reportés les taux de greffage, exprimés en mmol d'organosilanes par gramme de silice, calculés à l'aide des analyses élémentaires de ces particules. Nous n'avons pas pu évaluer le taux de greffage à l'aide de l'analyse ATG. En effet le complexe incorporé dans les particules commence à se dégrader aux alentours de 290 °C alors que les organosilanes greffés ne sont pas totalement dégradés à cette température. Les taux d'incorporation déterminés par ATG ne sont donc pas fiables.

Les taux de greffage sont compris dans la gamme 0,15 – 1,00 mmol.g⁻¹ pour les particules de 25 nm, de 0,1 – 0,56 mmol.g⁻¹ pour celles de 48 nm et de 0,10 – 1,00 mmol.g⁻¹ pour celles de 68 nm. Sachant que la surface spécifique est de 161 et 49 m².g⁻¹ respectivement pour les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si de 25 et 68 nm et considérant qu'un organosilane occupe une

surface de $0,25 \text{ nm}^2$ ¹⁵⁸, nous pouvons déterminer le taux de greffage maximum pour un recouvrement en monocouche, il est de 1,06 et $0,32 \text{ mmol.g}^{-1}$ respectivement pour les nanoparticules bifonctionnelles de 25 et 68 nm. L'examen des valeurs du Tableau III.10 montre que les nanoparticules bifonctionnelles de 25 et 68 nm sont recouvertes d'une monocouche d'organosilane excepté les particules Ru(bpy-Si)@Si-A de 68 nm. Comme nous n'avons pas mesuré la surface spécifique des nanoparticules de 48 nm, nous ne pouvons pas affirmer que dans ce cas nous avons obtenu une monocouche mais les valeurs obtenues entre 0,11 et $0,56 \text{ mmol.g}^{-1}$ vont dans le sens de la formation d'une monocouche. Il est à noter que l'hexaméthylidisilazane, **E**, qui ne peut pas donner d'oligomères, conduit obligatoirement à la formation d'une monocouche. Le taux de $0,31 \text{ mmol.g}^{-1}$ obtenu avec les particules de 68 nm correspond à un recouvrement complet de la surface des nanoparticules.

Les valeurs obtenues illustrent bien que le taux de greffage est dépendant des propriétés stériques et électroniques de chaque organosilane. Plus l'encombrement stérique des organosilanes est grand et plus faible est le taux de greffage comme illustré avec l'octylalkoxysilane, **F**, et N-(3-triméthoxysilylpropyl) ethylenediamine triacétate de sodium, **B**, lesquels donnent les plus faibles taux de greffage ($0,10$ - $0,15$ et $0,18 \text{ mmol.g}^{-1}$). Nous pouvons noter que dans le cas du 3-aminopropyltriéthoxysilane, **A**, la réaction de greffage est auto-catalysée ; en effet il y a d'abord adsorption rapide de la fonction amine à la surface de la silice suivie d'une condensation entre l'organosilane et la silice.¹¹⁷

Fonctionnalisation	$\tau_{AE} (\text{mmol.g}^{-1})$		
	25 nm	48 nm	68 nm
Ru(bpy-Si)@Si-A	0,93	0,36	1,00
Ru(bpy-Si)@Si-B	0,18	0,18	0,18
Ru(bpy-Si)@Si-C	1,00	0,21	0,37
Ru(bpy-Si)@Si-D	0,57	-	0,28
Ru(bpy-Si)@Si-E	0,56	0,56	0,31
Ru(bpy-Si)@Si-F	0,15	0,11	0,10

Tableau III.10 – Taux de greffage des nanoparticules greffées de tailles différentes déterminés par analyse élémentaire

Les clichés TEM des particules bifonctionnalisées montrent que la fonctionnalisation de surface n'affecte pas la taille et la forme des nanoparticules, ceci est illustré avec les particules Ru(bpy)@Si-B dans la Figure III.13.

¹⁵⁸ Dulcey, C. S.; Georger, J. H.; Chen, M.-S.; McElvany, S. W.; O'Ferrall, C. E.; Benezra, V. I.; Calvert, J. M., *Langmuir* **1996**, *12*, 1638-1650.

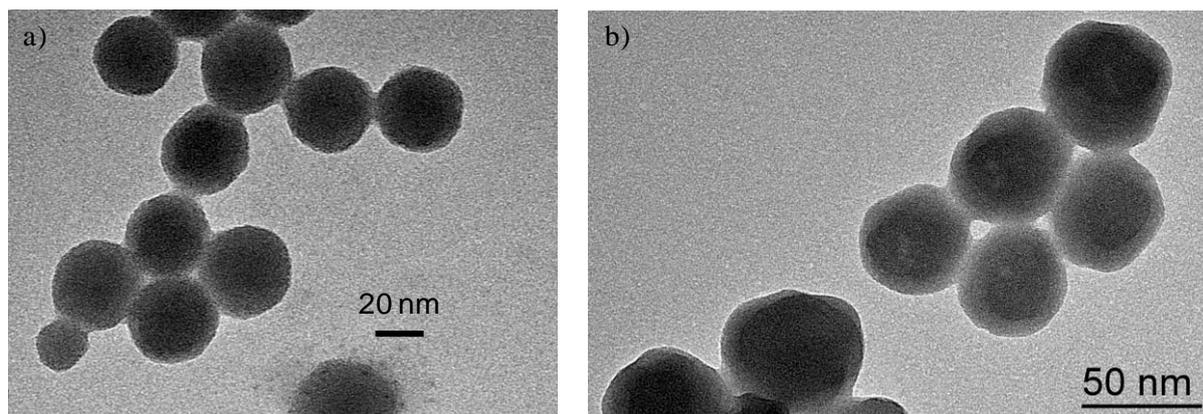


Figure III.13 – Clichés MET des particules Ru(bpy-Si)@Si-B avant (a) et après fonctionnalisation (b)

3.2. Caractérisations des nanoparticules de silice luminescentes fonctionnalisées

3.2.1. Caractérisations physico-chimiques par RMN du solide et DRIFT

La Figure III.14 présente les spectres CP MAS RMN du ^{29}Si des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-X (X = A-F) de taille 48 nm. Les signaux Q^4 , Q^3 et Q^2 caractéristiques de la silice sont présents respectivement à -110, -101 et -92 ppm. Comme les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions, la comparaison des spectres permet d'affirmer que les organosilanes sont liés de façon covalente à la matrice de silice. En effet les particules bifonctionnelles donnent des signaux T^3 à -67 ppm plus intenses que les particules Ru(bpy-Si)@Si, cette augmentation d'intensité des signaux T^3 , caractéristiques d'organosilanes totalement condensés sur la silice, est aussi accompagnée de l'apparition des signaux T^2 à -57 ppm, caractéristiques d'une condensation non complète de l'organosilane. Le spectre des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-E (Figure III.14b) diffère de ceux des autres nano-hybrides par la présence d'un signal de type M^1 à 12 ppm attribué à $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

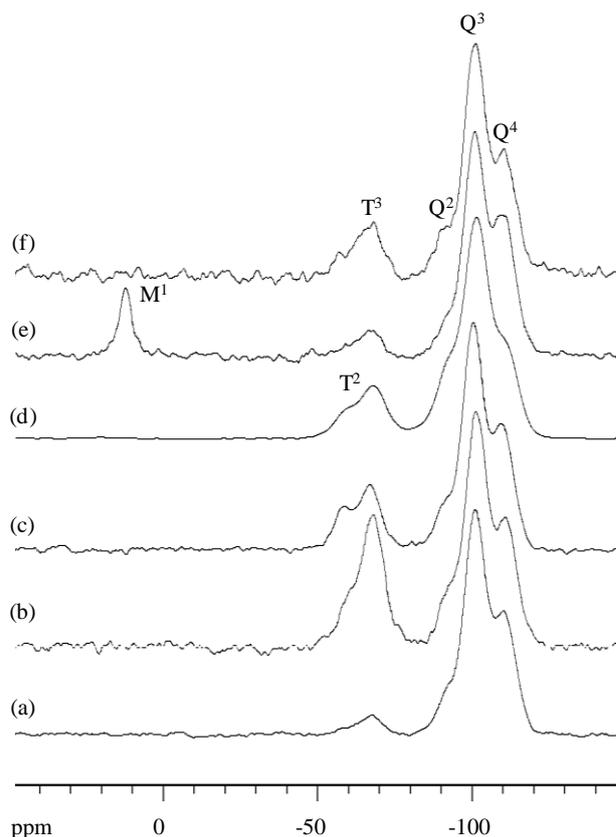


Figure III.14 - Spectres RMN CP MAS du ^{29}Si de $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ (a), $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-A}$ (b), $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-B}$ (c), $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-C}$ (d), $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-E}$ (e), $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-F}$ (f)

La spectroscopie CP MAS RMN du ^{13}C permet de vérifier l'intégrité chimique des molécules incorporées et greffées à la surface des nanoparticules (Figure III.15). Tous les spectres des particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-X}$ présentent des signaux communs attribués aux cycles aromatiques des bipyridines (domaine 125 - 160 ppm) et, excepté pour $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-E}$, aux signaux des groupements méthylène notés C-a et C-b de la chaîne propyle (environ 10 ppm et 23 ppm) des organosilanes. Il est à noter que les signaux des méthylènes en α et β de l'atome de silicium des organosilanes **A**, **B**, **C**, et **F**, (C-a et C-b) se superposent aux signaux des carbones C-10 et C-11 du complexe qui eux aussi sont en α et β d'atome de silicium du complexe. Pour les nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-A}$, ces signaux sont bien plus intenses que les signaux correspondants aux particules non greffées en surface, alors que ce n'est pas le cas avec les nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-F}$. Cette observation est à mettre en rapport avec les valeurs des taux de greffage mesurés pour $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-A}$ et $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-F}$ respectivement $0,38 \text{ mmol.g}^{-1}$ et $0,11 \text{ mmol.g}^{-1}$. Les particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-B}$ et $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-C}$ dont les taux de greffage sont intermédiaires ($0,21$ et $0,18 \text{ mmol.g}^{-1}$) ne conduisent pas à des augmentations d'intensité aussi nette de ces signaux. Il à noter que l'organosilane **E** ne présente pas de groupements méthylène en α et β d'atome de silicium.

Les différences relevées sur les spectres des différentes nanoparticules bifonctionnelles sont les suivantes :

- Pour Ru(bpy-Si)@Si-A le carbone en α du groupement amine (C-c) est caractérisé par le pic à 43 ppm. Le pic à 70 ppm révèle des traces de triton X-100.
- Les groupements carboxylates (C-g) de Ru(bpy-Si)@Si-B résonnent à 180 ppm. Le spectre présente aussi les signaux des différents groupements méthylène (C-d, C-e, C-f et C-c) en α des fonctions amines dans la zone allant de 50 à 60 ppm.
- Les groupements méthylène (C-c) et méthyle (C-d) en α de l'ammonium quaternaire de Ru(bpy-Si)@Si-C donnent des pics caractéristiques qui apparaissent à 68 et 53 ppm respectivement.
- Les méthyles (C-i) situés en α du silicium des particules Ru(bpy-Si)@Si-E résonnent à 0,3 ppm.
- Les signaux des atomes de carbone de la chaîne octyle de Ru(bpy-Si)@Si-F apparaissent sous forme d'un signal très large aux alentours de 50 ppm.

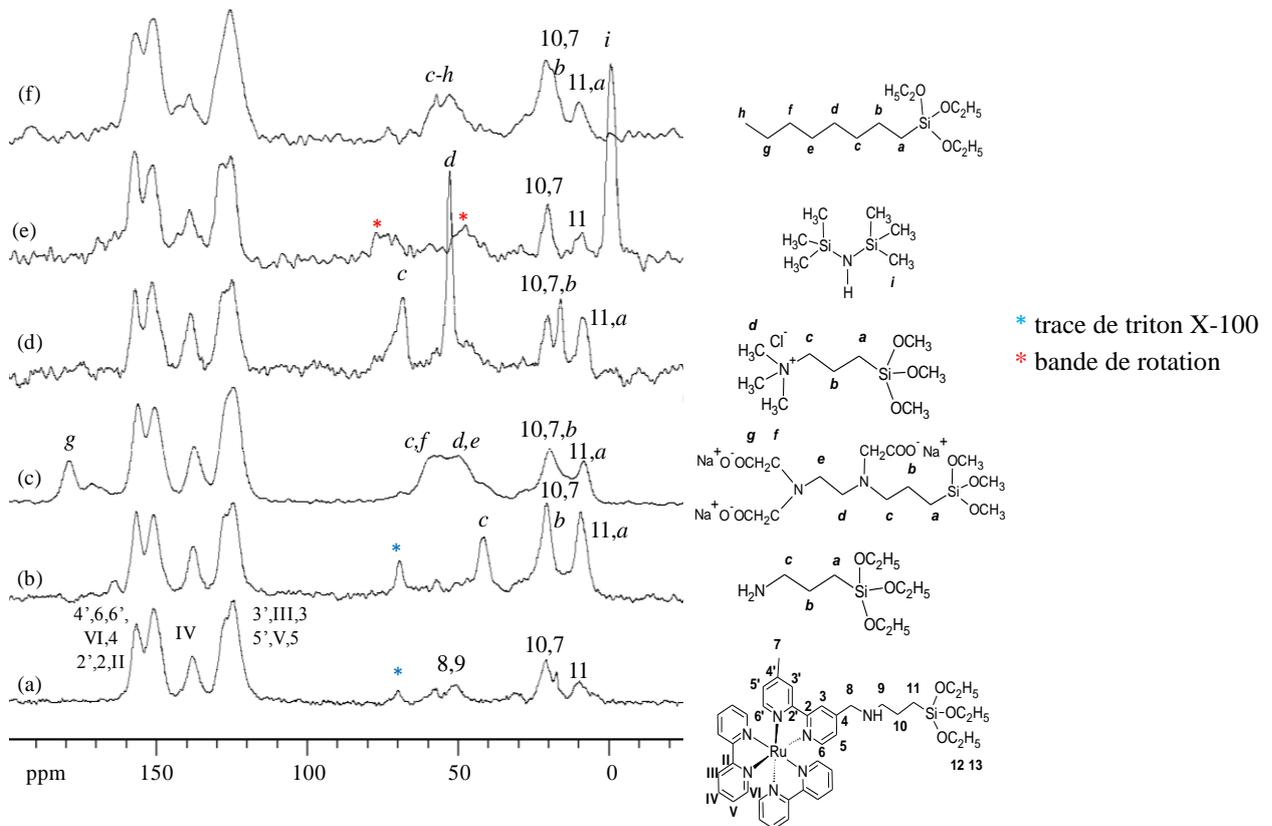


Figure III.15 – Spectres RMN CP MAS du ^{13}C des particules Ru(bpy-Si)@Si (a), Ru(bpy-Si)@Si-A (b), Ru(bpy-Si)@Si-B (c), Ru(bpy-Si)@Si-C (d), Ru(bpy-Si)@Si-E (e), Ru(bpy-Si)@Si-F (f)

Le spectre des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-**D** n'est pas présenté dans les Figure III.14 et Figure III.15 car l'organosilane **D** n'a pas été greffé sur les nanoparticules de 48 nm, mais les particules Ru(bpy-Si)@Si-**D** de 68 nm ont été caractérisées en RMN CP MAS du ^{13}C et du ^{29}Si pour les particules de 68 nm. Le spectre du ^{13}C se différencie de celui de Ru(bpy-Si)@Si-**C**, par un pic très intense à 30 ppm attribué aux 19 groupements méthylène de la chaîne alkyle.

Le complexe incorporé et les groupements fonctionnels greffés à la surface des nanoparticules ont également été identifiés par DRIFT. Dans tous les échantillons, la présence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]^{2+}$ est confirmée grâce aux bandes d'élongation $\nu(\text{C}=\text{N})$ et $\nu(\text{C}=\text{C})$ des ligands bipyridines, les nombres d'ondes de ces vibrations restent inchangées par rapport à celles du spectre de Ru(bpy-Si)@Si. Les bandes propres de chaque nanoparticule Ru(bpy-Si)@Si-**X** sont détaillées ci-dessous :

- La chaîne propyle de l'aminosilane se caractérise par un très faible pic à 2937 cm^{-1} lié à la vibration d'élongation C-H dans les groupements CH_2 .
- Le spectre de Ru(bpy-Si)@Si-**B** présente deux bandes caractéristiques très intenses à 1597 et 1409 cm^{-1} . Elles sont respectivement attribuées aux bandes d'élongation asymétrique et symétrique des groupements carboxylate.
- Le triméthylammonium quaternaire de Ru(bpy-Si)@Si-**C** conduit à 4 bandes pour les vibrations C-N une intense à 1478 cm^{-1} et trois d'intensité moyenne à 3019 , 997 et 911 cm^{-1} .
- Le spectre de Ru(bpy-Si)@Si-**D** se différencie de celui de Ru(bpy-Si)@Si-**C** par la présence des bandes très intenses d'élongation asymétrique et symétrique des groupements CH_2 à 2919 et 2858 cm^{-1} . Du fait du grand nombre de groupements CH_2 dans la molécule, ces pics sont fins et intenses.
- La fonction Si- CH_3 est souvent caractérisée par une bande très intense à $1280\text{-}1255\text{ cm}^{-1}$ due à une déformation symétrique de la liaison C-H dans CH_3 , mais à cause de la forte et intense bande d'absorption de la silice dans cette région, ce pic caractéristique est masqué. Cependant dans le spectre de Ru(bpy-Si)@Si-**E**, on observe les bandes d'élongation de Si-C et de déformation (rocking) du CH_3 à respectivement 846 et 769 cm^{-1} ainsi que la bande d'élongation C-H des groupements CH_3 à 2959 cm^{-1} .

- Le spectre de Ru(bpy-Si)@Si-**F** montre clairement trois bandes fines à 2965, 2929 et 2860 cm^{-1} correspondant respectivement aux bandes d'élongations asymétriques des groupements CH_3 et CH_2 et de la bande d'élongation symétrique des groupements CH_2 .

Pour un même organosilane **X** greffé, quelle que soit la taille des nanoparticules bifonctionnelles, les analyses RMN CP MAS du ^{13}C , du ^{29}Si et DRIFT sont identiques.

3.2.2. Caractérisations physico-chimiques de l'extrême surface des nanoparticules

Nous avons réalisé les analyses XPS sur les particules fonctionnalisées de 48 nm car cette spectroscopie semi-quantitative qui permet une analyse fine des fonctions chimiques en surface des matériaux. Nous avons décidé de présenter uniquement les résultats obtenus avec les atomes pertinents selon les organosilanes greffés (Figure III.16).

✓ Ru(bpy-Si)@Si-**A**

La déconvolution du pic N 1s des particules Ru(bpy-Si)@Si avait révélé la présence d'azote ayant deux environnements différents, C-N=C et NH à respectivement 400,1 et 398,7 eV. Le greffage de l'APTES (**A**) à la surface des nanoparticules entraîne deux effets (Figure III.16a). Le premier est une diminution du rapport de ces composantes (399,9 et 398,8 eV). Le greffage a entraîné une augmentation de l'intensité de la composante à 398,8 eV constitué des signaux NH du complexe et NH_2 de l'APTES greffé. Le second effet est la présence d'une composante supplémentaire à 401,5 eV qui correspond à la forme protonée de l'amine ($-\text{NH}_3^+$). La protonation de l'APTES à la surface du quartz et du verre a déjà été observée en XPS.^{159,160} Cette analyse montre bien l'importance de coupler différentes techniques d'analyses car les spectroscopies RMN et DRIFT n'ont pas permis de mettre en évidence la présence la forme protonée de l'amine à l'état solide.

✓ Ru(bpy-Si)@Si-**B**

Les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-**B** possèdent des groupements carboxylate en surface. Cependant la déconvolution du pic C 1s de Ru(bpy-Si)@Si-**B** ne fait pas apparaître la composante $\text{O}=\text{C}-\text{O}^-$ qui devrait apparaître dans la fourchette 288,5 – 289,6 eV.¹²² En revanche comparé à Ru(bpy-Si)@Si, une augmentation significative de l'intensité de la composante C=O à 287,9 eV est observée (Figure III.16b). De plus, la spectroscopie XPS a

¹⁵⁹ Kowalczyk, D.; Słomkowski, S.; Chehimi, M. M.; Delamar, M., *Int. J. Adhes. Adhes.* **1996**, *16*, 227-232.

¹⁶⁰ Wang, D.; Jones, F. R., *J. Mater. Sci.* **1993**, *28*, 2481-8.

mis en évidence la présence des ions sodium (pic à 1071 eV), ions des carboxylates (Figure III.16c). L'augmentation de la composante C=O et la présence d'ions sodium nous permet d'affirmer la présence de groupements O=C-O⁻.

✓ Ru(bpy-Si)@Si-C

Le greffage de l'organosilane **C** conduit très distinctement à l'apparition d'une troisième composante (-N⁺(CH₃)₃) à 402,6 eV¹⁶¹ sous le pic N 1s e (Figure III.16d). Tout comme pour Ru(bpy-Si)@Si-**B**, les contre-ions sont détectés sur le spectre en effet les ions chlorure donnent un pic à 197,4 eV (Figure III.16e). Dans cet échantillon, nous avons donc relevé la présence des contre-ions chlorure de l'organosilane **C**, ce qui n'était pas le cas pour les contre-ions chlorure du complexe dans Ru(bpy-Si)@Si, indiquant bien qu'ils ne sont pas incorporés dans la matrice de silice.

✓ Ru(bpy-Si)@Si-E

Après le greffage de l'hexaméthylidisilazane **E**, le pic Si 2p perd sa symétrie (Figure III.16f). La déconvolution du pic Si 2p montre un pic très caractéristique de Si(CH₃)₃ à 101,9 eV.¹⁶²

Nous n'avons pas fait l'analyse XPS de Ru(bpy-Si)@Si-**F** car la chaîne alkyle ne donnerait que les pics dus à C-C et C-H et l'interprétation de ces pics est délicate à cause de la couche de pollution.

¹⁶¹ Kelemen, S. R.; Afeworki, M.; Gorbaty, M. L.; Kwiatek, P. J.; Solum, M. S.; Hu, J. Z.; Pugmire, R. J., *Energy Fuels* **2002**, *16*, 1507-1515.

¹⁶² Lee, R. C.; Aita, C. R.; Tran, N. C., *J. Vac. Sci. Technol., A* **1991**, *9*, 1351-4.

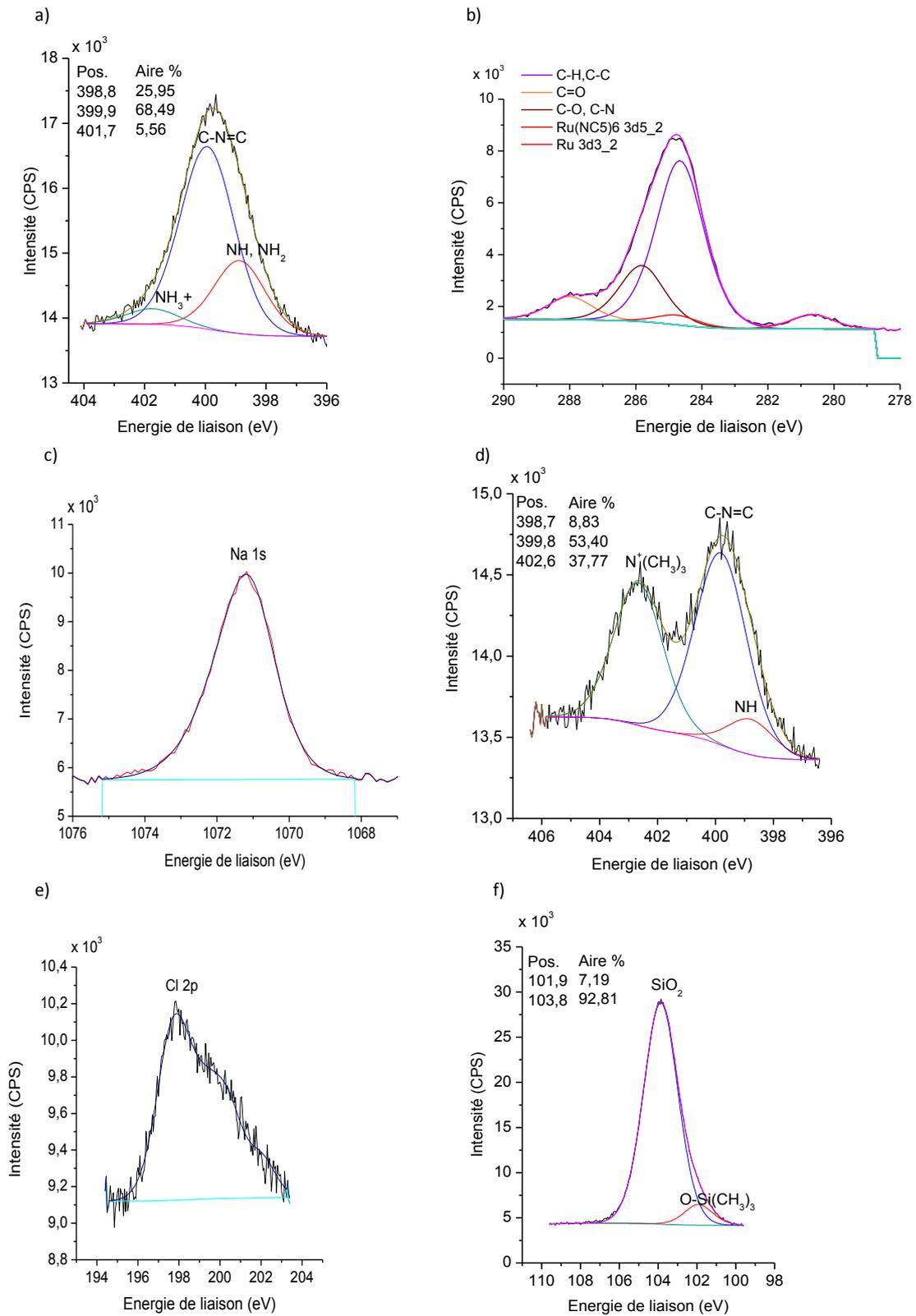


Figure III.16 – Déconvolution des signaux XPS a) N 1s de Ru(bpy-Si)@Si-A, b) C 1s de Ru(bpy-Si)@Si-B, c) Na 1s de Ru(bpy-Si)@Si-B, d) N 1s de Ru(bpy-Si)@Si-C, e) Cl 2p de Ru(bpy-Si)@Si-C, f) Si 2p de Ru(bpy-Si)@Si-E

✓ Analyse spectroscopique semi-quantitative

La spectroscopie XPS étant une technique semi-quantitative, nous avons déterminé les rapports atomiques N/Ru et Si/Ru à partir des pourcentages atomiques expérimentaux des éléments présents dans les particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-**X** (Tableau III.11). Le rapport N/Ru nous informe sur le greffage des organosilanes **A**, **B** et **C**. En effet en comparant le rapport N/Ru des particules non fonctionnalisées Ru(bpy-Si)@Si (6,6) et des particules greffées, nous pouvons noter une augmentation pour Ru(bpy-Si)@Si-**A**, Ru(bpy-Si)@Si-**B** et Ru(bpy-Si)@Si-**C**. Cette tendance est attendue puisque les organosilanes **A**, **B** et **C** sont porteurs d'azote. Ce rapport nous renseigne également sur les taux de greffage. La plus grande valeur du rapport N/Ru obtenue avec les particules Ru(bpy-Si)@Si-**A** (N/Ru = 28) comparée à celle obtenue avec Ru(bpy-Si)@Si-**C** (N/Ru = 11,6) est en accord avec un plus grand taux de greffage de Ru(bpy-Si)@Si-**A** (0,36 mmol.g⁻¹) comparée à celui obtenu avec Ru(bpy-Si)@Si-**C** (0,21 mmol.g⁻¹). Le rapport N/Ru des particules Ru(bpy-Si)@Si-**E** (N/Ru = 7) n'est pas affecté par le greffage car les groupements triméthylsilyl sont exempts d'atomes d'azote. Les rapports Si/Ru montrent bien l'apport de silicium à la surface des nanoparticules par la réaction de greffage. Hormis pour les particules Ru(bpy-Si)@Si-**B**, les valeurs de ce rapport suivent la même tendance que les taux de greffage.

	Ru(bpy-Si) @Si	Ru(bpy-Si) @Si- A	Ru(bpy-Si) @Si- B	Ru(bpy-Si) @Si- C	Ru(bpy-Si) @Si- E
Si 2p (% at)	30,9	28,5	31,5	28,8	31,1
C 1s (% at)	10,4	17,8	8,7	13,7	15,3
N 1s (% at)	1,0	2,8	1,0	1,4	0,7
O 1s (% at)	57,5	50,7	58,7	55,2	55,8
Ru 3d (% at)	0,15	0,10	0,09	0,12	0,10
Cl 2p (% at)	-	-	-	0,8	-
Na 1s (% at)	-	-	0,7	-	-
N/Ru exp.	6,6	28,0	11,1	11,6	7,0
Si/Ru exp.	206	285	350	240	311
τ_{AE} (X)	-	0,36	0,18	0,21	0,56

Tableau III.11 – Pourcentage atomique des différents éléments détectés sur les nanoparticules de silice fonctionnalisées. Rapports atomiques mesurés pour les particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-**X**

Bien que la spectroscopie de photoélectrons X soit une technique semi-quantitative, elle donne des tendances cohérentes avec les analyses élémentaires.

Rappelons que la luminescence des nanoparticules perturbe les mesures de DLS, il en est de même pour les mesures de potentiel zêta. Ainsi, nous avons synthétisé des nanoparticules de silice sans luminophore qui ont été fonctionnalisées dans les conditions vues précédemment (milieu anhydre, silice déshydratée, $\Omega = 2 \text{ mmol.g}^{-1}$). Nous nous sommes assurés que les taux de greffage de ces particules sont les mêmes que celles des particules luminescentes correspondantes (Tableau III.10).

- Le potentiel zêta des particules greffées par **A** ($0,9 \pm 5 \text{ mV}$) est plus grand que celui des particules non greffées ($-39 \pm 5 \text{ mV}$). Le passage vers les valeurs positives s'explique par le fait qu'à $\text{pH} = 6$ (pH relevé lors des mesures) la forme prédominante de l'amine est sa forme protonée. En effet le pK_A de l'amine de l'APTES est de 10,6 à 25°C ¹⁶³, donc dans l'eau à $\text{pH} = 6$ la forme acide $-\text{RNH}_3^+$ prédomine.
- Le potentiel zêta des particules greffées par **B** ($-47 \pm 5 \text{ mV}$) diminue par rapport aux particules non greffées, ce qui est dû à l'apport supplémentaire de charges négatives des groupements carboxylates.
- Les mesures de potentiel zêta des nanoparticules greffées avec les deux ammoniums quaternaires (**C** et **D**) conduisent aux mêmes valeurs. Le potentiel zêta augmente de $-39 \pm 5 \text{ mV}$ à $43 \pm 5 \text{ mV}$ et $42 \pm 5 \text{ mV}$ respectivement pour les particules Ru(bpy-Si)@Si-**C** et Ru(bpy-Si)@Si-**D**. Cette augmentation du potentiel zêta est attendue et confirme que l'on conserve le caractère cationique des ammoniums quaternaires.
- Concernant les particules greffées par **F** et **E** ($-32 \pm 5 \text{ mV}$), les potentiels zêtas sont légèrement moins négatifs que ceux obtenus avec les particules non greffées. Les groupements octyle et méthyle étant neutres, ils n'apportent aucune charge mais après leur greffage, les groupements Si-O^- sont moins nombreux ce qui a pour conséquence une légère diminution de la charge globale des nanoparticules.

Le potentiel zêta, ζ , nous permet de discuter de la stabilité des nanoparticules en solution. En effet il est admis que quand $\zeta > |40 \text{ mV}|$ ¹⁶⁴ les particules ont une bonne stabilité en solution, ce qui est le cas des particules greffées par le carboxylate (**B**) et les deux ammoniums quaternaires (**C** et **D**). Les particules sont dites modérément stables quand ζ est compris entre

¹⁶³ Niu, D.; Li, Y.; Dong, W.; Zhao, W.; Li, L.; Shi, J., *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 6519-6524.

¹⁶⁴ ASTM Standard D 4187-82, **1985**.

$|40-30 \text{ mV}|^{164}$ ce qui est le cas des particules greffées par **F** et **E**. Par contre, le potentiel zêta des particules greffées par **A** est proche de 0 et donc ces particules auront tendance à s'agglomérer en solution et sédimenter¹⁶⁴, ce nous avons observé visuellement au bout de quelques minutes.

Au paragraphe 2.3.2 dans la section XPS, nous avons montré que les particules luminescentes concentrent le complexe de ruthénium à l'intérieur et non en surface, nous pouvons donc penser que les potentiels zêtas des particules Ru(bpy-Si)@Si-**X** sont très proches de ceux des particules correspondantes non luminescentes.

3.2.3. *Evaluation du caractère hydrophile-hydrophobe des nanoparticules de silice fonctionnalisées*

Nous avons évalué le caractère hydrophile-hydrophobe des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-**X**. Pour cela nous avons choisi deux méthodes, la détermination du Log P et la mesure de l'angle de contact.

✓ Tentative de détermination du coefficient de partage (Log P)

A notre connaissance, la détermination de Log P pour des nanoparticules en solution n'a jamais été reportée dans la bibliographie. Nous nous sommes basés sur ce qui est décrit pour des molécules en solution.

En chimie organique, le Log P est une valeur couramment utilisée pour déterminer le caractère hydrophile-hydrophobe des molécules. Log P est le logarithme du rapport des concentrations d'une espèce donnée dans deux solvants non miscibles, qui sont généralement l'octanol et l'eau, $\text{Log P} = \text{Log} (C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$. Si Log P est positif cela signifie que la molécule est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau ce qui reflète le caractère hydrophobe de la molécule et inversement. La technique la plus couramment employée pour déterminer la répartition de l'espèce dans les deux phases est la spectroscopie UV-visible.

Nous avons adapté cette technique aux particules, mais pour cela il a fallu s'assurer que les particules Ru(bpy-Si)@Si-**X** suivent la loi de Beer-Lambert, c'est-à-dire que l'absorbance des particules est proportionnelle à la concentration de ces dernières.

Pour déterminer l'absorbance, nous nous sommes placés à une longueur d'onde égale à 456 nm, qui correspond à la transition de transfert de charge métal-ligand du complexe. Pour s'affranchir des problèmes éventuels de sédimentation, les mesures ont été faites très rapidement après la préparation des solutions. Les mesures ont été effectuées sur les

nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-**X** (hormis **C**) de 25 nm de diamètre. La Figure III.17 montre que les particules supposées hydrophiles, Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-**A** et Ru(bpy-Si)@Si-**B**, suivent la loi de Beer-Lambert quel que soit le solvant, tandis que les particules supposées hydrophobes Ru(bpy-Si)@Si-**D**, Ru(bpy-Si)@Si-**E** et Ru(bpy-Si)@Si-**F** ne suivent pas la loi dans l'eau ($R^2 < 0,8$). En effet la mise en suspension de ces dernières dans l'eau est très difficile. Par conséquent nous avons appliqué cette méthode uniquement aux particules supposées hydrophiles.

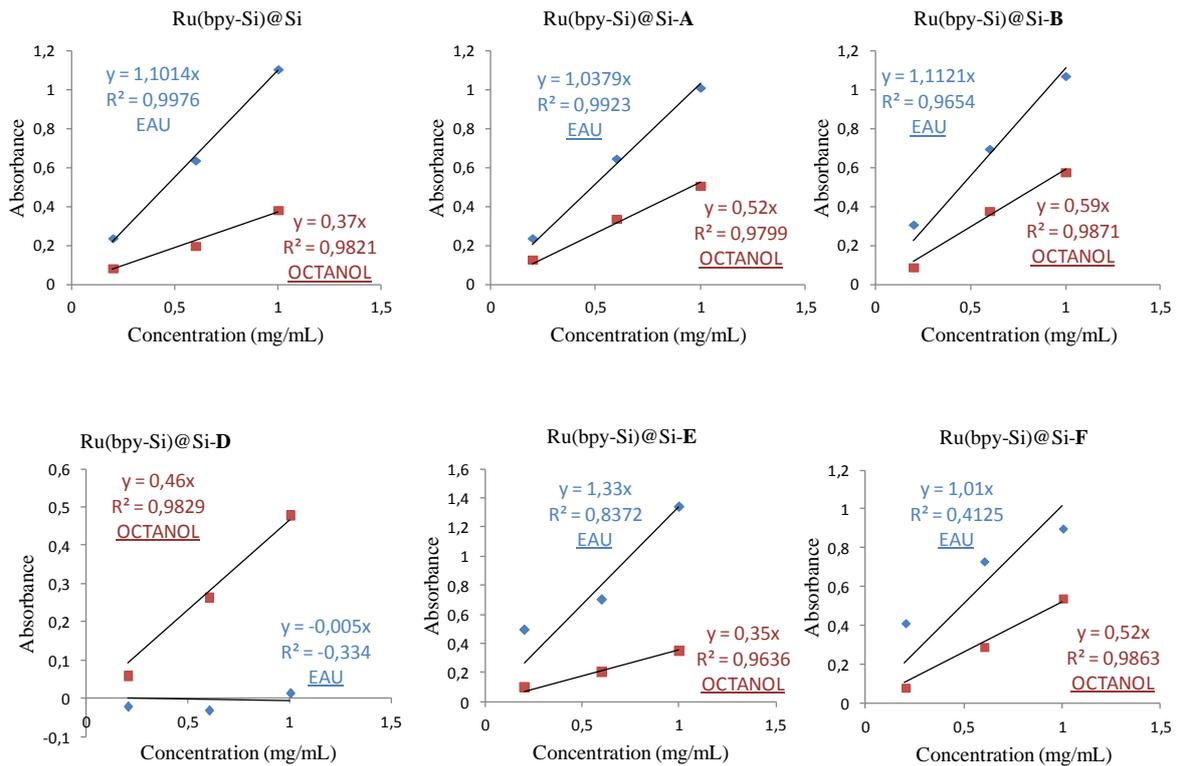


Figure III.17 – Courbes d'étalonnage de Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A, Ru(bpy-Si)@Si-B, Ru(bpy-Si)@Si-D, Ru(bpy-Si)@Si-E et Ru(bpy-Si)@Si-F dans l'eau et l'octanol pour la détermination du Log P

Une fois la loi de Beer-Lambert vérifiée, nous avons déterminé le Log P par la méthode du flacon agité. Elle consiste à mélanger une quantité connue de particules dans un volume connu d'octanol et d'eau en agitant le flacon puis de mesurer la concentration des particules dans chaque solvant par spectroscopie UV-visible. La séparation de phase entre l'eau et l'octanol est très lente car il y a formation d'une émulsion. Les mesures d'absorbance en absence de particules ont permis de déterminer une durée minimale de 24 heures pour qu'il y ait séparation de phase complète entre les deux solvants. Ce résultat nous conduit à faire les mesures d'absorbance à 36 heures après que le mélange eau/octanol/particules ait été agité. Les mesures sont réalisées à partir de suspensions contenant 2 mg de particules Ru(bpy-Si)@Si ou Ru(bpy-Si)@Si-**A** ou Ru(bpy-Si)@Si-**B** dans un mélange eau/octanol (v/v, 1/1)

pour un volume total de 5 mL. Les valeurs mesurées c'est-à-dire l'absorbance dans l'eau et dans l'octanol, ainsi que les concentrations des particules déterminées à partir des courbes d'étalonnage sont présentées dans le Tableau III.12. La valeur négative de Log P reflète le caractère hydrophile des trois sortes de particules et montre que les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-A sont les plus hydrophiles en solution.

Particules	Abs _{oct}	Abs _{eau}	C _{oct} massique	C _{eau} massique	Log P = Log(C _{oct} /C _{eau})
Ru(bpy-Si)@Si	0,010	0,162	0,027	0,147	-0,73 ± 0,04
Ru(bpy-Si)@Si-A	0,010	0,181	0,018	0,175	-0,98 ± 0,09
Ru(bpy-Si)@Si-B	0,030	0,388	0,050	0,349	-0,84 ± 0,06

Tableau III.12 – Détermination du Log P des particules Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A et Ru(bpy-Si)@Si-B

Le total des concentrations devrait être de 0,4 mg/mL. Cependant cette valeur n'est pas retrouvée pour les particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-A, sans doute lié au fait qu'une partie des nanoparticules reste à l'interface eau/octanol, phénomène que l'on observe visuellement.

✓ Mesure de l'angle de contact

N'ayant pas pu déterminer le caractère hydrophile-hydrophobe des particules supposées hydrophobes, nous avons mesuré l'angle de contact des particules, méthode plus conventionnelle que la précédente. Les mesures d'angle de contact de la poudre ne sont pas homogènes, c'est pourquoi nous avons effectué des pastilles à l'aide d'une pastilleuse. Les mesures ont été réalisées à partir des nanoparticules de 25 nm (Figure III.18).

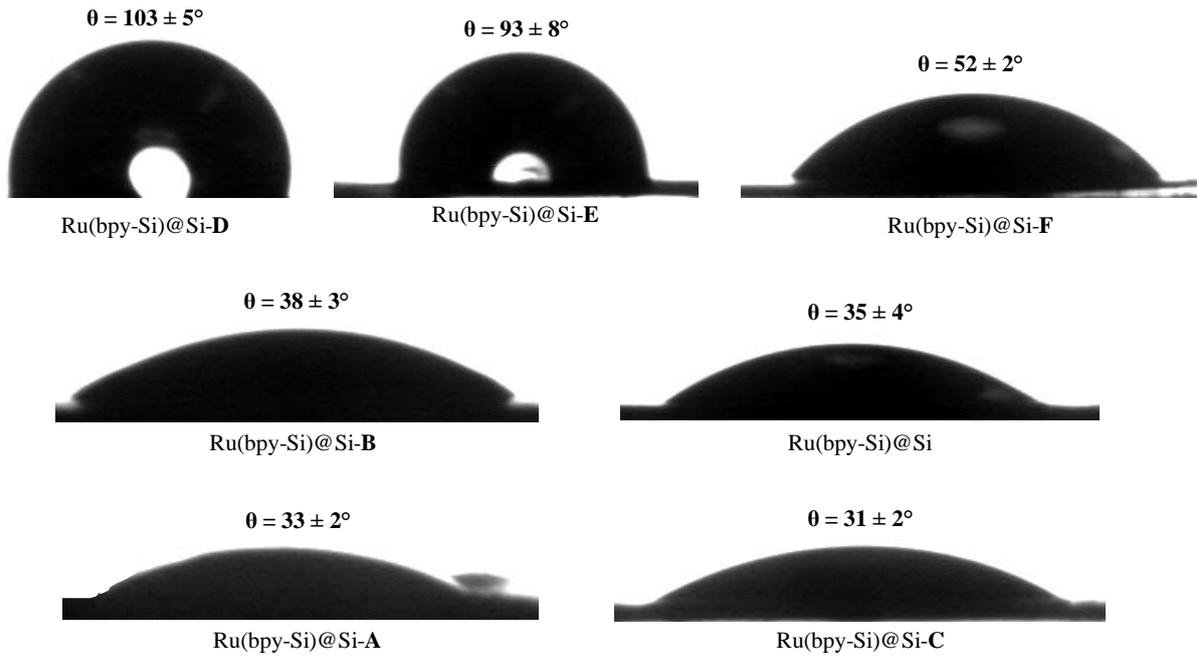


Figure III.18 – Clichés d'angle de contact réalisés sur des pastilles de nanoparticules chimiquement modifiées

Plus l'angle mesuré est élevé plus la surface est hydrophobe. Les particules sont classées par hydrophobicité croissante : $\text{Ru(bpy-Si)@Si-C} < \text{Ru(bpy-Si)@Si-A} < \text{Ru(bpy-Si)@Si} < \text{Ru(bpy-Si)@Si-B} < \text{Ru(bpy-Si)@Si-F} < \text{Ru(bpy-Si)@Si-E} < \text{Ru(bpy-Si)@Si-D}$. La différence d'angle de contact est faible entre les particules hydrophiles ; par contre, une nette différence est observée dans le cas des particules hydrophobes. Les particules Ru(bpy-Si)@Si-E et Ru(bpy-Si)@Si-D ont des taux de greffage identiques ($0,57$ et $0,56 \text{ mmol.g}^{-1}$). L'origine de cette différence est la présence de la longue chaîne carbonée dans l'organosilane **D**. Pour les particules Ru(bpy-Si)@Si-F , le faible angle de contact par rapport aux particules Ru(bpy-Si)@Si-E et Ru(bpy-Si)@Si-D peut s'expliquer par le faible taux de greffage de l'organosilane **F**.

4. Propriétés de luminescence des nanoparticules en solution

Le travail entrepris dans cette partie consiste à vérifier la capacité des nanoparticules à luminescer. Etant amenés à utiliser ces nanoparticules en milieu aqueux pour des applications biologiques et notamment l'étude de biofilms, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la luminescence en solution. Nous avons étudié l'allure des spectres, les effets de la fonctionnalisation et du pH.

4.1. Spectre d'excitation et d'émission de Ru(bpy-Si)@Si

Nous avons enregistré le spectre d'excitation et d'émission des particules Ru(bpy-Si)@Si en milieu aqueux (Figure III.19a-b). Le spectre d'excitation obtenu est comparé à celui du complexe libre (Figure III.19a). Tout comme le complexe libre, la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand et le transfert de charge métal-ligand (TCML) sont observés à 285 et 450 nm respectivement. Nous avons donc excité les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si à ces deux longueurs d'onde et nous avons décidé de travailler à $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm car l'intensité des spectres d'émission des particules Ru(bpy-Si)@Si est plus élevée que celle obtenue à $\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm (Figure III.19b). Le spectre d'émission des particules Ru(bpy-Si)@Si est toujours une large bande d'émission qui émet entre 600 à 775 nm avec un maximum d'émission à 640 nm.

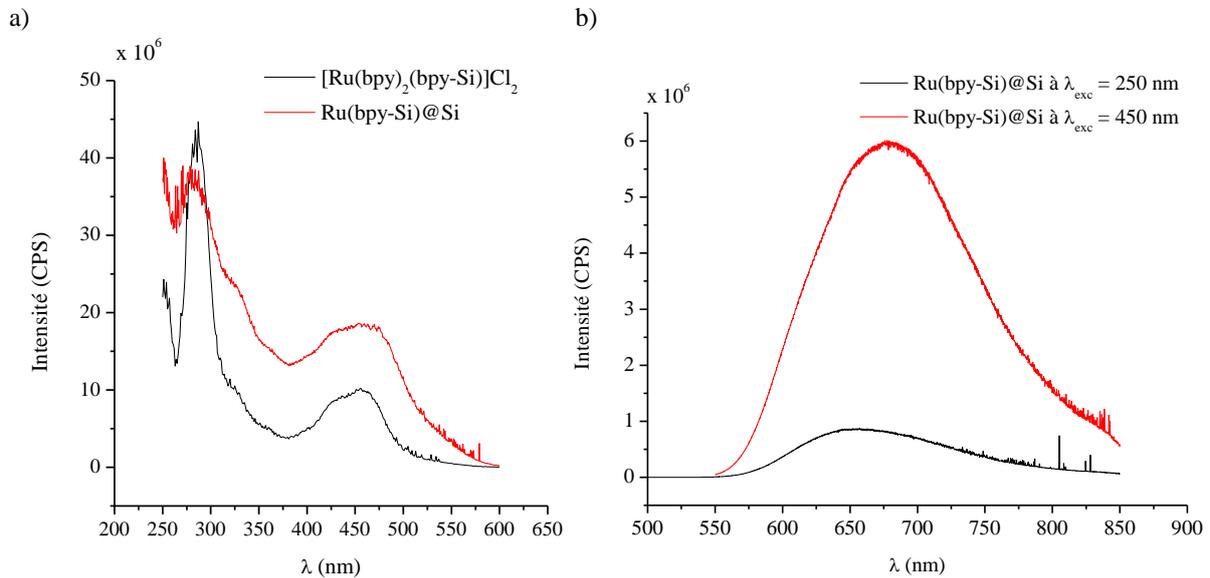


Figure III.19 – a) Spectres d'excitation de Ru(bpy-Si)@Si (rouge) et [Ru(bpy)₂(bpy-Si)]Cl₂ (noir) ; b) Spectres d'émission de Ru(bpy-Si)@Si (rouge) à $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm et à $\lambda_{\text{exc}} = 270$ nm (noir)

Dans les mêmes conditions de mesure et à $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm, le spectre d'émission des particules Ru(bpy-Si)@Si montre une intensité supérieure à celle du complexe libre (Figure III.20). Ce phénomène est largement décrit dans la bibliographie^{90,53,138} car la silice préserve le complexe du photo-quenching causé par les molécules d'oxygène. Lorsque l'on incorpore le complexe dans la silice, on observe également sur les spectres d'émission un faible effet bathochrome de l'ordre de 6 nm comme dans le cas de l'encapsulation de [Ru(bpy)₃]²⁺.⁶⁸ Dans notre cas, la liaison covalente entre la silice et le complexe ne semble pas perturber la luminescence.

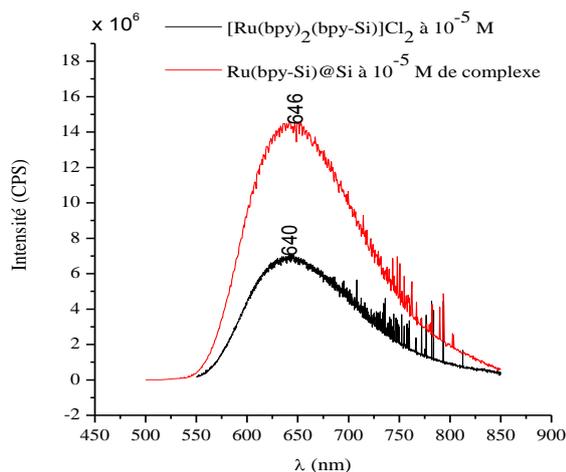


Figure III.20 – Spectres d'émission du complexe $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]Cl_2$ (noir) et $Ru(bpy-Si)@Si$ (rouge) à la même concentration à $\lambda_{exc} = 450\text{ nm}$

4.2. Effet de la fonctionnalisation

Nous pouvons noter que les organosilanes greffés à la surface des particules n'interfèrent pas avec le complexe car il n'y a pas de déplacement de l'émission entre les particules $Ru(bpy-Si)@Si$ et $Ru(bpy-Si)@Si-X$ (Figure III.21). Ce résultat est attendu puisque la fonctionnalisation se fait en surface alors que le complexe est localisé dans le cœur de la particule de silice.

Cependant nous observons pour les particules hydrophobes une diminution de l'intensité d'émission comparée aux particules hydrophiles. Nous expliquons cela par le fait que les particules hydrophobes ont plus tendance à rester à l'interface eau/air. Ainsi le faisceau de la lampe excite peu de particules luminescentes et par conséquent le signal d'émission de ces particules est moindre (Figure III.21).

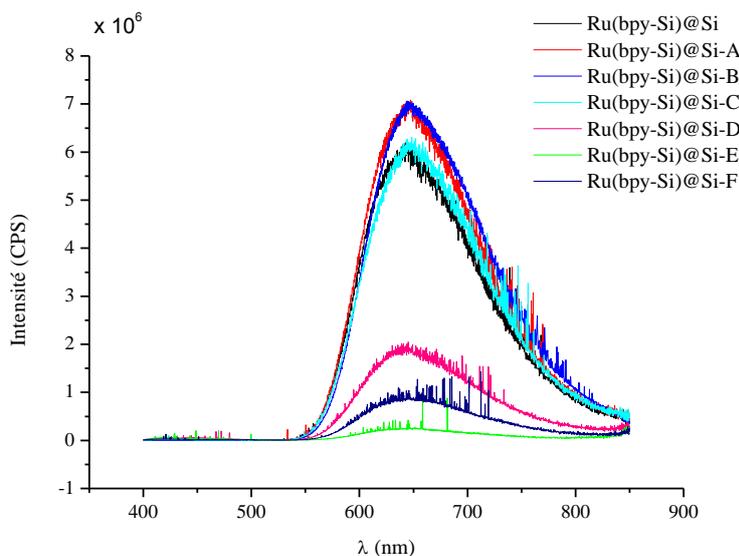


Figure III.21 – Superposition des spectres d'émission des particules fonctionnalisées

4.3. Effet du pH

Nous avons voulu évaluer l'effet du pH sur la luminescence des nanoparticules fonctionnalisées. Nous avons fait varier le pH de 1 à 11. Au-delà de $\text{pH} = 11$, la silice se dissout et le complexe est libéré dans le milieu. Aucun effet du pH n'est observé, ni de déplacement ni d'intensité des spectres d'émission, pour les nanoparticules bifonctionnelles. Cette observation montre que le complexe est bien protégé dans la silice.

4.4. Tentative de détermination du rendement quantique pour les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-X

Dans les mêmes conditions que le complexe libre, c'est-à-dire à 25°C , en eau saturée en air et à 436 nm , nous avons voulu déterminer le rendement quantique des particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-X, cependant cette méthode s'est révélée inadaptée. La principale raison est que nous ne sommes pas parvenus à avoir des suspensions dont les mesures d'absorbance soient inférieures à 0,1 à 436 nm car en plus du fait que le complexe absorbe, la silice absorbe elle-aussi (Figure III.22). Même en soustrayant la contribution de la silice, les absorbances restent supérieures à 0,1. Des auteurs ont reporté que les mesures de rendement quantique étaient optimales pour des absorbances comprises entre 0,04 et 0,06, et qu'au-delà de 0,1 des erreurs induites par les phénomènes de diffusion faussent les mesures de rendement quantique.¹⁴⁰ Dans le cas des suspensions, la détermination de l'absorbance sur fond de diffusion important reste un problème qui n'est pas résolu de façon systématique.

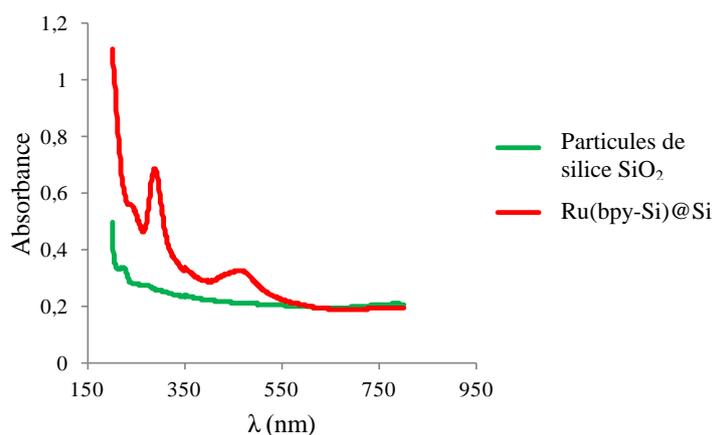


Figure III.22 – Spectres d'absorbance des particules de silice SiO_2 (vert) et des particules Ru(bpy-Si)@Si pour une concentration à $0,4\text{ mg.mL}^{-1}$

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé et caractérisé deux nouveaux complexes de ruthénium, cationique ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$) et moléculaire ($[\text{RuCl}_2(\text{bpy-Si})_2]$), possédant une ou deux fonctions alcoxysilane permettant de lier de façon covalente les complexes à la matrice de silice. Le rendement quantique a été déterminé pour le luminophore $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ par la méthode comparative, en eau saturée en air, à 25°C et est égal à 0,024, proche de celui de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ à 0,028. Contrairement aux complexes cationiques possédant des contre-ions tétrafluoroborate, le complexe homologue avec des contre-ions chlorures montre une bonne solubilité dans l'eau. Ceci nous a permis de l'incorporer dans la silice lors de l'élaboration des nanoparticules sphériques de silice luminescentes. En modifiant les paramètres tels que le rapport eau/surfactant, co-surfactant/surfactant et la nature de la microémulsion, des particules luminescentes de taille différente (25 ± 5 , 38 ± 6 , 48 ± 5 et 68 ± 2 nm) ont été obtenues.

Dans le but d'avoir des propriétés de surface variées (hydrophiles, hydrophobes, chargées positivement ou négativement), nous avons fonctionnalisé par réaction de greffage les nanoparticules luminescentes avec six organosilanes. L'obtention des nanoparticules recouvertes d'une monocouche d'organosilane à la surface a été réalisée en adaptant les conditions opératoires de greffage. Les réactions de greffage sont réalisées sur des nanoparticules de silice (préalablement chauffées sous vide) en milieu organique anhydre, pour empêcher l'hydrolyse des organosilanes pouvant conduire à des réactions d'homocondensation. La quantité introduite d'organosilanes est contrôlée et fixée à 2 mmol.g^{-1} . Ces conditions conduisent à la formation de monocouche d'organosilane à la surface des nanoparticules.

Ces nanoparticules bifonctionnelles, luminescentes et modifiées en surface, ont été complètement caractérisées. La microscopie électronique à transmission et à balayage ont montré que la taille et la forme des particules étaient conservées après la fonctionnalisation. Des analyses élémentaires et thermogravimétriques ont permis de déterminer les taux d'incorporation du complexe et les taux de greffage des organosilanes. Les analyses de spectroscopie (RMN du ^{13}C , ^{29}Si , DRIFT, XPS) ont montré que l'intégrité chimique des fonctions chimiques incorporées et greffées était conservée. Des mesures d'angle de contact

ont permis de confirmer le caractère hydrophile/hydrophobe des particules fonctionnalisées $Ru(bpy-Si)@Si-X$.

Etant amenés à travailler en milieu aqueux, nous avons également étudié les propriétés de photoluminescence en solution des particules bifonctionnelles. Deux points sont à retenir, tout d'abord un léger effet bathochrome (déplacement vers le rouge) est observé sur les spectres d'émission des particules $Ru(bpy-Si)@Si$, comme dans le cas de l'encapsulation de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, causé par l'interaction entre le complexe et la silice. Deuxièmement l'intensité du spectre d'émission des particules $Ru(bpy-Si)@Si$ est augmentée comparée au complexe libre. Ceci est dû au fait que la silice protège le complexe incorporé du photo-quenching. L'incorporation du complexe dans la silice améliore donc les propriétés de photoluminescence du complexe.

Au final nous disposons d'un panel de particules de taille et de propriété de surface différentes, qui ont été caractérisées et qui possèdent des propriétés de photoluminescence intéressantes.

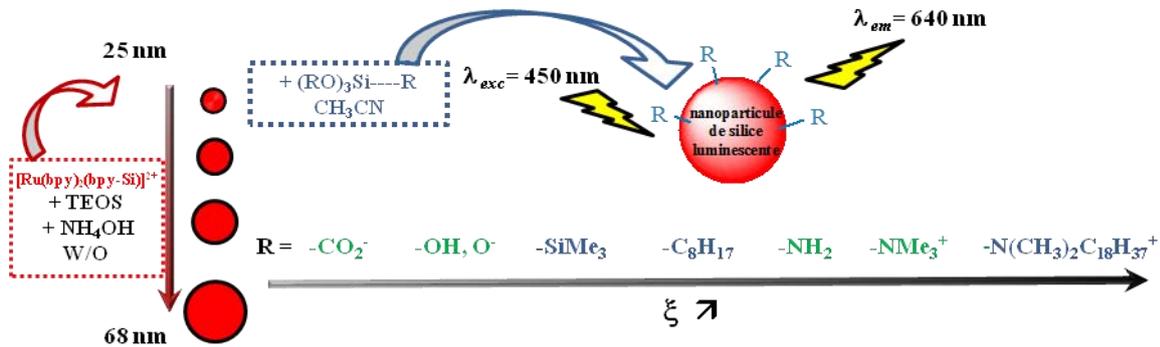


Schéma III.8 – Illustration des nanoparticules bifonctionnelles à disposition

Chapitre IV

Des nanoparticules de silice
bifonctionnelles pour l'exploration
de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*

1. Choix du milieu de culture pour l’obtention de biofilms.....	129
2. Test de cytotoxicité.....	133
2.1. Evaluation de la cytotoxicité par marquage LIVE/DEAD® des bactéries observées en microscopie confocale – Effet de la taille des particules	134
2.2. Evaluation de la cytotoxicité par dénombrement des UFC	137
3. Pénétration des nanoparticules de silice luminescentes.....	138
3.1. Optimisation du protocole pour l’introduction des nanoparticules de silice luminescentes	138
3.2. Distribution spatiale des nanoparticules dans les biofilms.....	141
3.2.1. Résultats.....	142
3.2.2. Discussion.....	150
4. Conclusion.....	151

Dans le chapitre précédent nous avons élaboré avec succès des nanoparticules de silice luminescentes bifonctionnelles. Nous avons à disposition des nanoparticules de taille différente possédant différents groupements fonctionnels hydrophiles, hydrophobes, cationiques et anioniques. Les bonnes propriétés de photoluminescence des nanoparticules de silice en milieu aqueux permettent leur utilisation en tant que sondes pour l'exploration de biofilms vivants visualisables par la microscopie confocale.

Dans les années 90, des auteurs^{36,39-43} ont mis en évidence la présence de canaux aqueux au sein des biofilms et ce, par l'intermédiaire de microbilles de latex luminescentes. Cette découverte a permis de montrer que les particules parvenaient à pénétrer dans les biofilms et de montrer l'existence de différents types de transport au sein de ceux-ci, notamment le transport advectif responsable de la pénétration rapide d'entités dans les biofilms et le transport par diffusion moléculaire. Cependant peu d'études³⁶ sont reportées sur la pénétration et la répartition des particules de taille nanométrique au sein des biofilms.

Le but de cette thèse est de mettre en évidence la pénétration et la répartition des particules dans le biofilm et dans les amas cellulaires du biofilm dans le but ultime d'atteindre une cible cellulaire. Avant d'atteindre les bactéries, les nanoparticules doivent passer au travers de l'EPS qui est une matrice constituée d'une grande variété de composés hydrophiles. La matrice d'EPS est essentielle pour le fonctionnement des biofilms comme la protection contre les agents stressants et la rétention d'eau mais l'hypothèse que l'EPS agisse comme une barrière physique contre des antibiotiques est simpliste¹⁶⁵, même s'il a déjà été prouvé que l'EPS affecte la pénétration et la diffusion d'entités chimiques dans les biofilms.^{44,166} En effet, la composition de l'EPS est très complexe avec une mise en évidence récente de domaines hydrophobes au sein d'une matrice hydrophile. Dans cette optique, nous avons travaillé avec un modèle de biofilm bactérien riche en EPS dans lequel nous avons introduit des sondes optiques chimiquement modifiées, pour comprendre dans un premier temps les interactions de ces nanoparticules avec la matrice extracellulaire du biofilm à *P. aeruginosa*.

1. Choix du milieu de culture pour l'obtention de biofilms

Les premières expériences ont consisté à obtenir des biofilms produisant de l'EPS. Nous avons testé deux milieux de culture, un milieu commercial TSB, classiquement utilisé en

¹⁶⁵ Rani, S. A.; Pitts, B.; Stewart, P. S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 728-732.

¹⁶⁶ Briandet, R.; Lacroix-Gueu, P.; Renault, M.; Lecart, S.; Meylheuc, T.; Bidnenko, E.; Steenkeste, K.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Fontaine-Aupart, M.-P., *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2135-2143.

culture bactérienne planctonique, et un milieu bouillon biofilm modifié (BBM) mis au point au laboratoire.¹²⁹ Différents auteurs¹³⁻¹⁵ ont reporté que la structure du biofilm, en forme de champignons, ainsi que la production d'EPS étaient des éléments clés pour la compréhension de la résistance accrue des bactéries confinées dans les biofilms. Pour étudier et comprendre le rôle de l'EPS dans le biofilm à *P. aeruginosa*, un modèle de biofilm présentant ces critères est nécessaire. Notre choix final se portera donc sur le milieu qui permettra d'avoir des biofilms structurés constitués d'EPS et en forme de champignons.

Composition BBM ¹²⁹	Composition TSB
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,10g/L	Caséine peptone (pancréatique), 17g/L
KH ₂ PO ₄ , 0,5g/L	K ₂ HPO ₄ , 2,5g/L
Na ₂ HPO ₄ , 1,25g/L	NaCl, 2,5g/L
Glucose	Soja peptone (papéine digérée), 3g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,2g/L	
FeSO ₄ .7H ₂ O, 0,0005g/L	

Tableau IV.1 – Composition des milieux de culture testés pour l'obtention d'un biofilm riche en EPS

Le milieu commercial TSB est un milieu riche en nutriments carbonés et azotés dont la composition chimique des deux constituants majeurs (d'origine naturelle) est variable, tandis que le bouillon biofilm modifié (BBM) est un milieu synthétique, moins nutritif, que ce soit en apport azoté ou carboné mais suffisamment pour permettre le développement de biofilm à *P. aeruginosa* (Tableau IV.1).

- Des biofilms à *P. aeruginosa* âgés de 3 jours ont été produits dans ces deux milieux de culture en condition pseudo-statique. Ce terme pseudo-statique est utilisé car des mouvements de fluide sont causés lors du trempage-retrait de la micropipette pendant les changements de milieu. Des changements de milieux réguliers sont réalisés pour éliminer la biomasse planctonique, ce qui favorise la multiplication des bactéries initialement adhérentes. La structure et la production d'EPS de ces derniers sont observées en microscopie confocale (Figure IV.1 et Figure IV.2). Le marquage des bactéries est assuré par le SYTO 9® ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$) qui émet dans le vert et l'EPS présent dans le biofilm est marqué par la Con A-AlexaFluor®633 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 673-790 \text{ nm}$) qui émet dans le rouge.

L'intérêt de la microscopie confocale est la possibilité de réaliser des « sections optiques » nettes en positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans le biofilm. Les acquisitions faites permettent d'obtenir des clichés en deux dimensions appelés « snapshots » dont le centre de l'image est une coupe du biofilm dans le plan xy, la droite de

l'image est une coupe du biofilm selon xz et le bas de l'image est une coupe du biofilm dans le plan yz. Pour exemple, les Figure IV.1 et Figure IV.2 sont des « snapshots ».

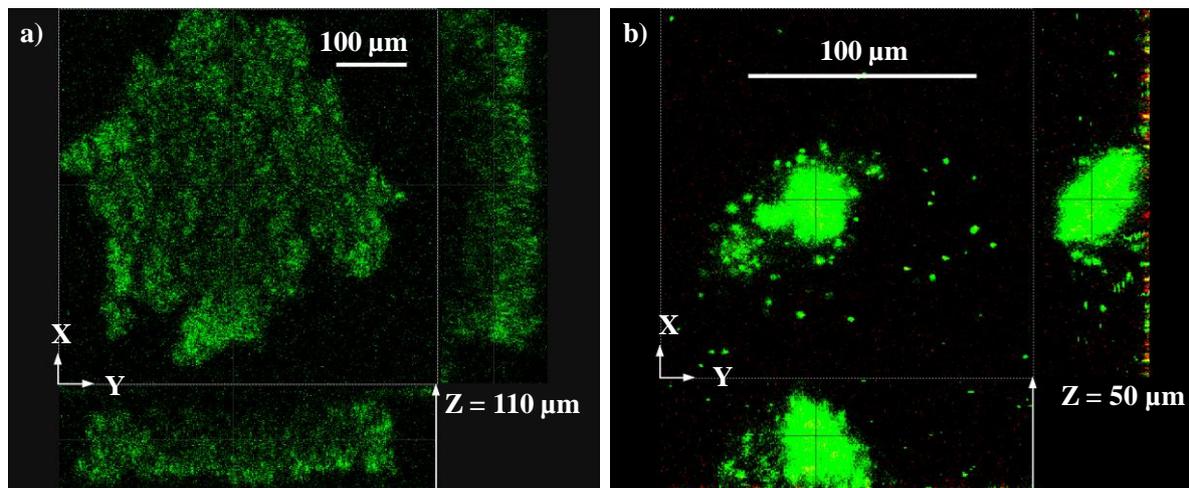


Figure IV.1 – Observation en microscopie confocale de biofilms à *P. aeruginosa* âgés de 3 jours obtenus en milieu TSB ; a) Biofilm en monocouche dont les bactéries sont marquées par le SYTO 9® ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$), b) Biofilm en forme de champignons marqué par le SYTO 9® ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$) et le Con A-AlexaFluor®633 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 673-790 \text{ nm}$)

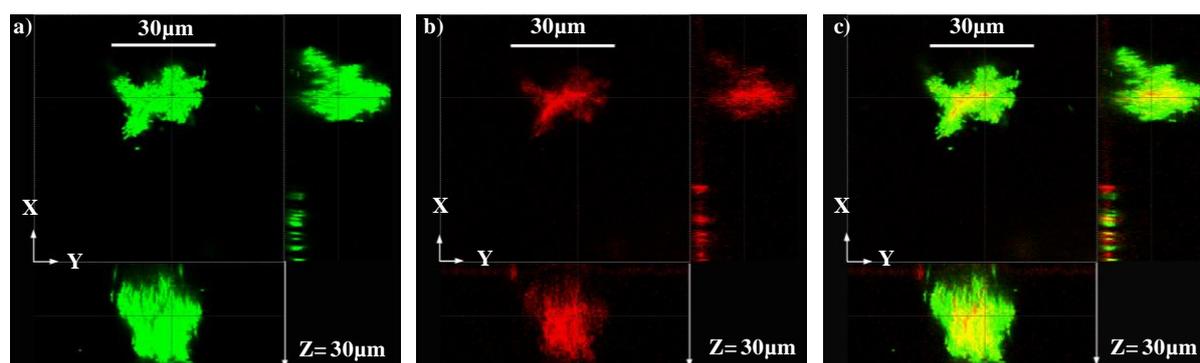


Figure IV.2 – Observation en microscopie confocale d'un biofilm à *P. aeruginosa* âgé de 3 jours obtenu en milieu BBM ; a) Les bactéries sont marquées par le SYTO 9® ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$) ; b) L'EPS est marqué par la Con A-AlexaFluor®633 ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 673-790 \text{ nm}$) ; c) Superposition des images a et b.

Les « snapshots » des biofilms obtenus **en milieu TSB** sont présentés dans les figures IV.1a-b. La Figure IV.1a montre un biofilm qui s'étend sur toute la surface visualisée. Le terme multicouche est utilisé pour décrire la structure de ce biofilm ainsi obtenu. Moins fréquemment, il arrive que des biofilms en forme de champignons (Figure IV.1b) soient observés. Dans les deux cas, ces structures peuvent atteindre 50 à 100 µm d'épaisseur. Le marquage de l'EPS des biofilms obtenus en milieu TSB par la ConA-AlexaFluor®633 (Figure IV.1b) montre que la présence d'EPS est relativement faible. En effet, les zones apparaissant en rouge montrent la présence d'EPS, les zones apparaissant en vert montrent les bactéries tandis que les zones apparaissant en jaune montre la présence simultanée de bactéries et d'EPS.

En milieu BBM, nous obtenons des biofilms en forme de champignons dont l'épaisseur est généralement comprise entre 10 et 40 μm en moyenne (Figure IV.2). Les bactéries et l'EPS sont marqués respectivement par le SYTO 9® et la ConA-AlexaFluor®633 (Figure IV.2a et IV.2b). La superposition de ces deux figures fait ressortir une partie jaune correspondant à la présence conjointe des bactéries et de l'EPS. Le marquage de l'EPS révèle sa présence dans tout le biofilm, avec une plus forte concentration d'EPS au cœur du biofilm (Figure IV.2b-c).

Au vu de ces résultats, il est clair que selon le milieu de culture utilisé, la production d'EPS dans les biofilms diffère. Des auteurs ont obtenu des résultats allant dans ce sens. Samrakandi *et al.*¹⁶⁷ ont travaillé sur la question controversée de l'efficacité de bactéricides (le chlore et la monochloramine) sur des biofilms constitués de différents EPS. Ils ont montré que dans le cas des biofilms à *P. aeruginosa*, les différents milieux de culture testés (milieu à base de sucrose ou milieu glycérol-nitrate d'ammonium) ont impacté la production d'EPS. Cependant les biofilms produisant une plus grande quantité de d'EPS ont montré une plus grande résistance vis-à-vis du chlore. Marty *et al.*¹⁶⁸ ont travaillé sur deux souches de *P. aeruginosa* mucoïdes. Ils ont montré que la composition de l'alginate (constituant majeur de l'EPS chez *P. aeruginosa*), c'est-à-dire le rapport mannuronate/guluronate ainsi que le degré d'O-acétylation étaient impactés par le milieu de culture utilisé.

Le milieu TSB est un milieu riche qui favorise la prolifération des bactéries en mode planctonique. Par conséquent, les biofilms formés sont essentiellement issus d'un dépôt de bactéries. Ce mode de croissance explique la formation de biofilms en monocouche. Contrairement au milieu TSB, le milieu BBM moins nutritif est assimilable à des conditions environnementales stressantes. Ces conditions favorisent une croissance des biofilms en forme de champignons. Des résultats antérieurs de Khalilzadeh *et al.*¹²⁹ ont démontré par dénombrement des bactéries planctoniques, qu'en milieu BBM, la croissance planctonique n'a pas lieu et que ce sont les bactéries adhérentes à la surface qui se multiplient pour former le biofilm. Ce mode de croissance est plus représentatif des biofilms rencontrés dans la nature.

Bien qu'en milieu TSB il soit possible d'obtenir des biofilms avec quelques formes de champignons, pour la suite de l'étude, notre choix se porte sur le milieu BBM qui permet d'obtenir des biofilms produisant une quantité plus conséquente en EPS et des

¹⁶⁷ Samrakandi, M. M.; Roques, C.; Michel, G., *Can. J. Microbiol.* **1997**, *43*, 751-758.

¹⁶⁸ Marty, N.; Dournes, J.-L.; Chabanon, G.; Montrozier, H., *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *98*, 35-44.

biofilms structurés en forme de champignons, issus de la multiplication des bactéries adhérentes à la surface.

Dans le but d'obtenir des biofilms plus épais nous avons augmenté le temps d'incubation de 3 jours à 7 jours. En effet, la densité des bactéries adhérentes et l'épaisseur des biofilms augmentent au cours du temps. Nous observons cependant à certains moments des biofilms présentant un creux à l'intérieur de la structure. La présence de cette zone creuse laisse penser que le biofilm est en train de se disperser (Figure IV.3). Ces observations illustrent probablement l'étape de détachement du biofilm, décrite dans le chapitre bibliographique. Compte-tenu de ces observations nous avons choisi de travailler sur un biofilm modèle de 3 jours.

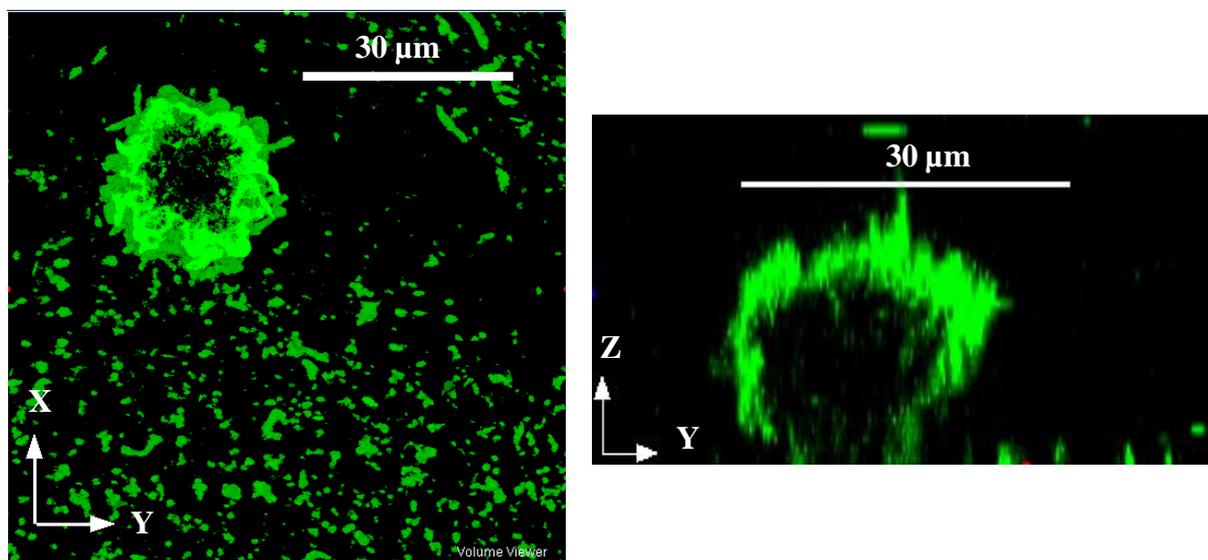


Figure IV.3 – Observation en microscopie confocale d'un biofilm à *P. aeruginosa* de 7 jours, dans le milieu BBM, marqué par le SYTO 9[®] ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$) sur deux coupes suivants xy et zy

2. Test de cytotoxicité

Des études de biocompatibilité et de bio-distribution des nanoparticules de silice luminescentes sur des cellules humaines⁹⁵ ou animales¹⁶⁹ ont déjà été réalisées. Les résultats montrent fréquemment des effets de taille et de concentration. Zhao *et al.*⁹⁵ ont démontré que pour des concentrations élevées en nanoparticules (0,5 mg/mL), de petites tailles (23 nm) et après un temps de contact prolongé (72 h) avec des cellules épithéliales humaines (A549), la prolifération de ces dernières était fortement affectée. Cependant, à notre connaissance,

¹⁶⁹ Kim, J. S.; Yoon, T.-J.; Yu, K. N.; Kim, B. G.; Park, S. J.; Kim, H. W.; Lee, K. H.; Park, S. B.; Lee, J.-K.; Cho, M. H., *Toxicological Sciences* **2006**, *89*, 338-347.

aucune étude de cytotoxicité des nanoparticules de silice luminescentes ont été réalisées sur des bactéries *P. aeruginosa*.

Pour la validation les études d'exploration avec les nanoparticules de silice au sein des biofilms, des tests de cytotoxicité sont réalisés. Cette étude doit permettre de répondre à deux questions. L'introduction des nanoparticules aurait-elle un effet sur la structure du biofilm ? Les nanoparticules de silice luminescentes présentent-elles un effet antimicrobien et/ou anti-biofilm en fonction de la taille et de la concentration massique des nanoparticules ? Pour répondre à ces interrogations, nous avons fait le choix de travailler avec deux techniques complémentaires pour l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules de silice, le marquage LIVE/DEAD® des bactéries observés en microscopie confocale et le dénombrement des bactéries viables sur boîtes (UFC = Unités Formant Colonies).

2.1. Evaluation de la cytotoxicité par marquage LIVE/DEAD® des bactéries observées en microscopie confocale – Effet de la taille des particules

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet des nanoparticules de silice luminescentes non fonctionnalisées (Ru(bpy-Si)@Si) et des nanoparticules de silice (SiO₂) de 48 nm sur la structure des biofilms par microscopie confocale. Les expériences sont réalisées sur des biofilms à *P. aeruginosa* âgés de 3 jours cultivés en milieu BBM sur lesquels une suspension de nanoparticules à 0,5 mg/mL est introduite. Le temps de contact est fixé à 24 heures.

Après l'introduction des nanoparticules de SiO₂ (Figure IV.4b) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si (Figure IV.4c), les microcolonies et les bactéries sont toujours présentes. Dans les deux cas, d'un point de vue qualitatif, l'épaisseur (48 et 40 µm) et la forme des biofilms en forme de champignons sont conservées par rapport au biofilm de référence (Figure IV.4a). Les nanoparticules de silice SiO₂ et les particules Ru(bpy-Si)@Si n'ont donc pas d'effet sur la structure tridimensionnelle des biofilms.

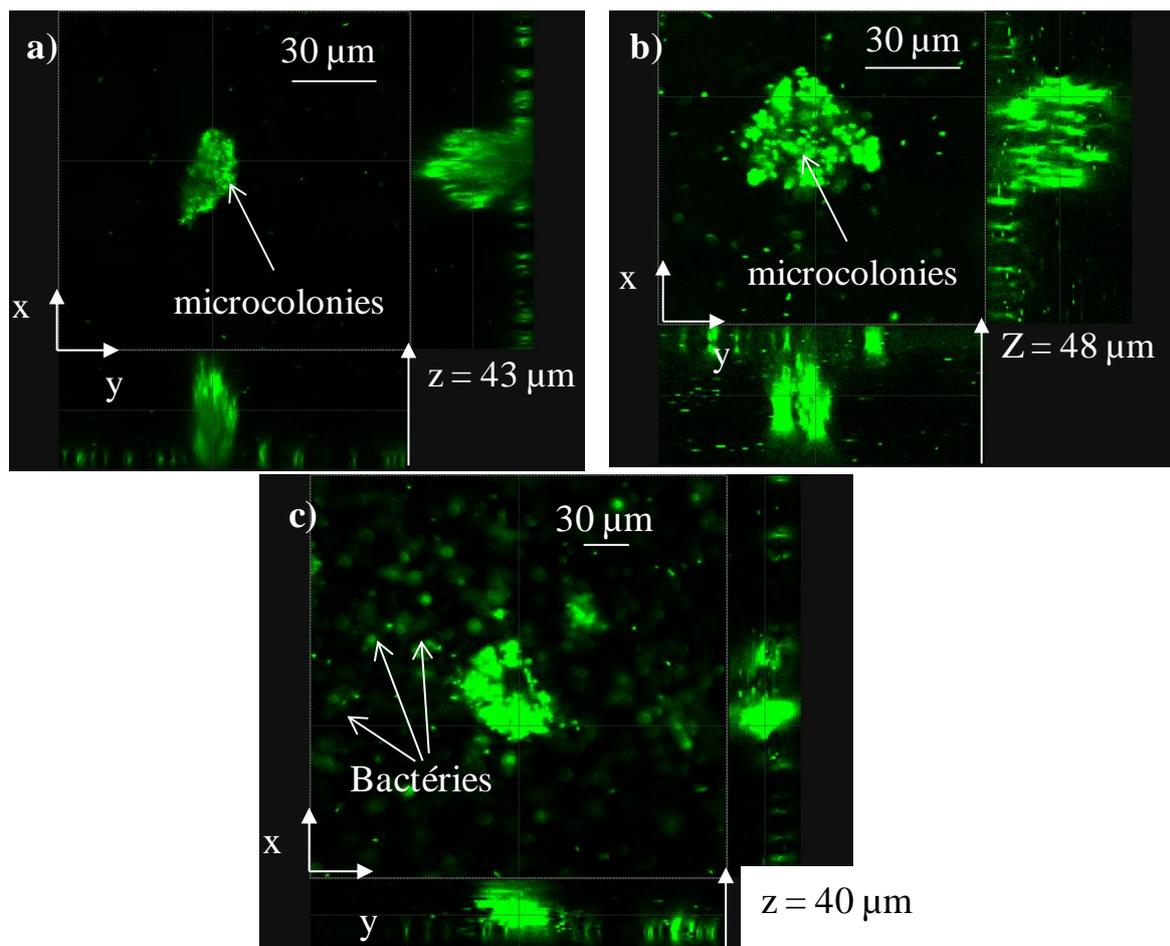


Figure IV.4 – a) Clichés en microscopie confocale d'un biofilm à *P. aeruginosa* de 3 jours ; Biofilm à *P. aeruginosa* de 3 jours après 24 heures de contact avec les nanoparticules de silice SiO_2 à 0,5 mg/mL; c) Biofilm à *P. aeruginosa* de 3 jours après 24 heures de contact avec les nanoparticules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ à 0,5 mg/mL

Dans un second temps, nous avons évalué la viabilité des bactéries en présence de nanoparticules de silice de 25, 48 et 68 nm, par le marquage LIVE/DEAD®. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la section « structure du biofilm ». Pour rappel (Chapitre II-page 79), le kit LIVE/DEAD® est en partie composé d'une sonde spécifique marquant les bactéries endommagées, l'iodure de propidium (IP), qui est excité à $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ et qui émet dans le rouge ($\lambda_{\text{em}} = 600 - 700 \text{ nm}$). L'utilisation simultanée des nanoparticules luminescentes $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$ ($\lambda_{\text{em}} = 600 - 700 \text{ nm}$) et de l'IP n'est donc pas possible puisque nous ne pourrions pas différencier les signaux des deux luminophores. C'est la raison pour laquelle, dans cette section, nous travaillons avec des nanoparticules de silice SiO_2 . Le marquage LIVE/DEAD® va permettre d'évaluer qualitativement le rapport de bactéries viables sur les bactéries endommagées dans le biofilm, ce qui informe sur la cytotoxicité des nanoparticules testées. **En résumé les bactéries endommagées ou mortes sont marquées en rouge orangé alors que les bactéries viables sont marquées en vert.**

Les résultats du test de cytotoxicité sont présentés sur des images tridimensionnelles (Figure IV.5a-d). L'intérêt principal de la microscopie confocale est la possibilité de reconstituer des images tridimensionnelles à partir de « coupes optiques » acquises par balayage du plan xy à des hauteurs différentes (incrément en z) dans le biofilm. Pour exemple, les Figure IV.5a-d sont des reconstitutions tridimensionnelles des biofilms étudiés où les bactéries sont marquées par le SYTO 9® ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 498 - 533 \text{ nm}$) et l'IP ($\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 553 - 673 \text{ nm}$). Les biofilms conservent la forme en champignons et ont des épaisseurs de l'ordre de 40-50 μm .

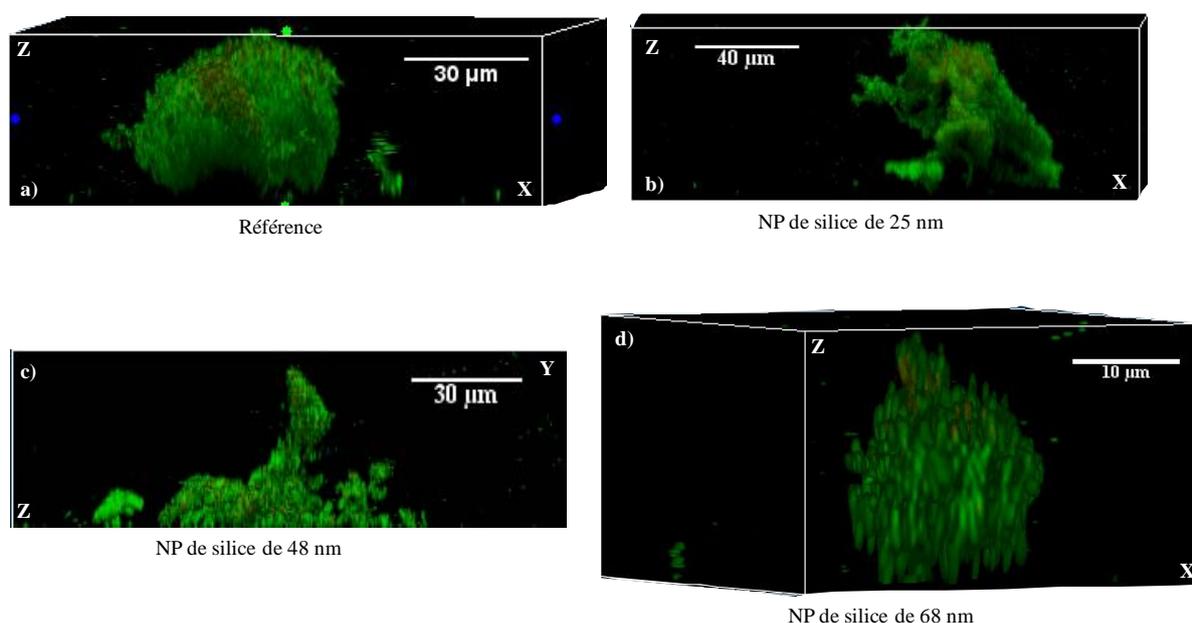


Figure IV.5 – Evaluation de la cytotoxicité des nanoparticules de silice (0,5 mg/mL) mises en contact pendant 24 heures sur biofilm à *P. aeruginosa* de 3 jours par marquage LIVE/DEAD®; a) Biofilm de référence en absence de nanoparticules ; b) Biofilm à *P. aeruginosa* en présence de particules de 25 nm ; c) Biofilm à *P. aeruginosa* en présence de particules de 48 nm ; d) Biofilm à *P. aeruginosa* en présence de particules de 68 nm

Le biofilm témoin (Figure IV.5a) présente très peu de bactéries mortes ou endommagées, celles-ci sont localisées un peu partout dans le biofilm mais cette tendance est plus accentuée à l'intérieur du biofilm où la population est la plus dense. Lorsque les nanoparticules de silice sont introduites dans le biofilm à *P. aeruginosa* âgé de 3 jours en milieu BBM, pour les nanoparticules de 25 nm et 48 nm (Figure IV.5b-c), la quantité de bactéries mortes est comparable au biofilm de référence. La répartition des bactéries mortes est assez diffuse dans le biofilm. Cependant il semblerait qu'il y ait un effet un peu plus visible dans le cas nanoparticules de silice de 68 nm sur le biofilm (Figure IV.5d). Les bactéries mortes sont très majoritairement localisées sur le sommet du biofilm. On pourrait faire un lien avec l'endroit le plus probable où s'accumulent les nanoparticules par dépôt.

Sur cette base, nous pouvons affirmer que les particules de 25 nm et 48 nm à une concentration massique fixée à 0,5 mg/mL ne présentent pas de toxicité (effet antibactérien et/ou anti-biofilm) vis-à-vis des biofilms. Bien que faible, un effet négatif est rencontré avec les nanoparticules de 68 nm.

2.2. Evaluation de la cytotoxicité par dénombrement des UFC

Pour confirmer des résultats qualitatifs, issus d'une observation visuelle par le marquage LIVE/DEAD®, nous avons déterminé de façon quantitative, par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC), les bactéries cultivables en présence ou non des nanoparticules de silice. Cette technique permet de dénombrer les bactéries présentes dans le milieu étudié. Pour rappel, la technique est présentée dans le chapitre II page 77. Les nanoparticules sont introduites sur un biofilm à *P. aeruginosa* de 3 jours avec un temps de contact de 24 heures. Nous avons réalisé l'étude avec les nanoparticules de silice luminescentes Ru(bpy-Si)@Si de 48 nm et 68 nm en faisant varier la concentration massique. Au bout de 3 jours, les microcolonies sont récupérées par grattage, incluses sur boîtes gélosées (TSA). Ces boîtes sont incubées pendant 48 heures à 37 °C et les UFC sont dénombrées. L'expérience est renouvelée à deux reprises et les résultats présentés sont moyennés et exprimés en Log de UFC/mL (Figure IV.6).

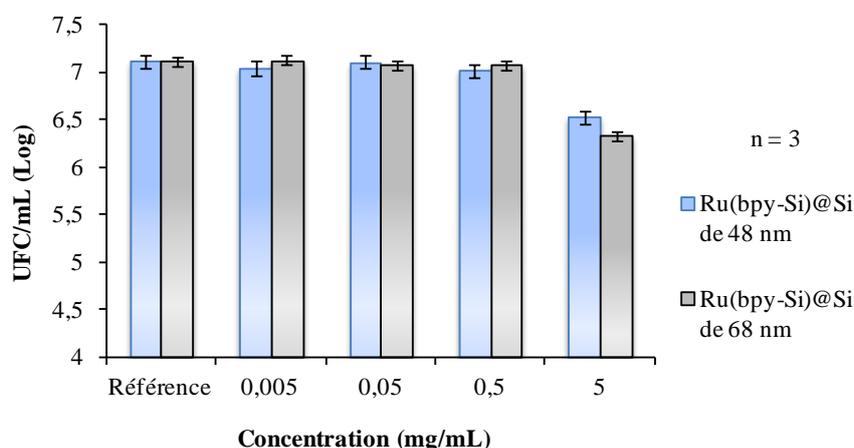


Figure IV.6 – Dénombrement des bactéries exprimé en Log de UFC/mL (moyenne \pm écart-type, n=3) après l'introduction des nanoparticules de silice de 48 nm et 68 nm sur des biofilms à *P. aeruginosa* de 3 jours pendant 24 heures de temps de contact

Nous avons fait varier la concentration massique des nanoparticules de 0,005 à 5 mg/mL. Nous pouvons observer que pour une concentration massique inférieure ou égale à 0,5 mg/mL les particules n'ont aucun effet toxique sur les bactéries et ce quelle que soit la taille des particules. Mais au-delà de cette valeur, le nombre de bactéries diminue significativement

d’un-demi log pour les particules de 48 nm à plus d’un demi-log pour les particules de 68 nm, comparé à la référence (Figure IV.6). Même si les tests sont faits sur des particules luminescentes non fonctionnalisées, Ru(bpy-Si)@Si, nous considérons que les particules bifonctionnelles se comportent de la même façon puisque les molécules greffées ne présentent pas d’activité toxique particulière, hormis les particules Ru(bpy-Si)-**D**, où l’organosilane **D** a été choisi pour ses propriétés antimicrobiennes.

La concentration maximale en nanoparticules de silice luminescentes devra être limitée à 0,5 mg/mL pour éviter toute activité antibactérienne et/ou anti-biofilm sur biofilm.

3. Pénétration des nanoparticules de silice luminescentes

3.1. Optimisation du protocole pour l’introduction des nanoparticules de silice luminescentes

Il est essentiel de déterminer des conditions optimales pour l’observation des biofilms en présence de nanoparticules en condition statique. Il nous a fallu déterminer la concentration optimale en nanoparticules et réaliser des traitements préalables afin d’améliorer les observations.

➤ Concentration optimale pour l’observation en microscopie confocale :

Dans la bibliographie, la concentration des sondes utilisées dans le marquage des biofilms est de l’ordre de 10^{-9} à 10^{-6} mol.L⁻¹.⁴⁴ Nous nous sommes donc placés dans cette gamme de concentrations pour évaluer les particules de silice. La concentration en ruthénium [Ru] exprimée en mol.L⁻¹ est fonction de la concentration massique en particules C_m exprimée en g/L et de la teneur en ruthénium τ_{Ru} exprimée en mol.g⁻¹.

$$[Ru] = C_m \times \tau_{Ru}$$

- Une suspension de nanoparticules de silice est introduite sur des biofilms à *P. aeruginosa* de 3 jours avec une mise en contact de 24 heures. Les concentrations testées sont comprises entre 10^{-8} à 10^{-6} M. **Ces tests ont été réalisés avec les nanoparticules non fonctionnalisées Ru(bpy-Si)@Si.**

Une très faible concentration en $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]^{2+}$ est suffisante pour visualiser les nanoparticules, même à une concentration de 10^{-8} mol.L⁻¹ (Figure IV.7). Cependant en présence du SYTO 9®, il est plus difficile de visualiser les nanoparticules du fait de la forte

brillance du SYTO 9®, nous contraignant à travailler à des concentrations supérieures à 10^{-8} mol.L⁻¹. Des résultats satisfaisants sont obtenus avec une concentration de 10^{-6} mol.L⁻¹, ce qui correspond à une concentration massique de 5 µg/mL inférieure à la concentration massique de 0,5 mg/mL, limite de cytotoxicité fixée.

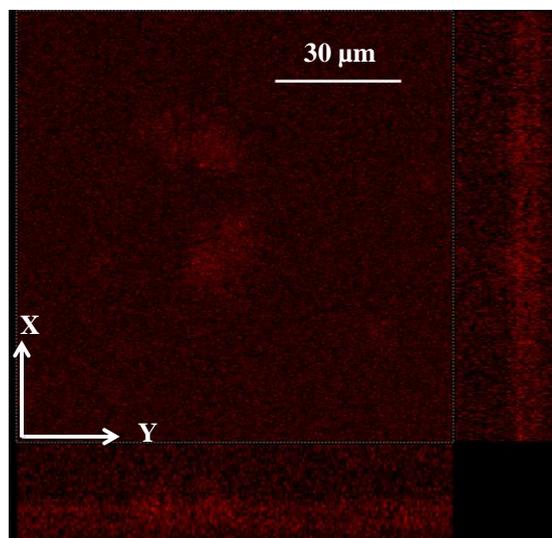


Figure IV.7 – Observation en microscopie confocale des particules Ru(bpy-Si)@Si à 0,005 mg/mL correspondant à une concentration en $[Ru(bpy)_2(bpy-Si)]^{2+}$ de 10^{-6} M

➤ Prétraitements avant observation en microscopie confocale:

Lavage : Les observations en microscopie confocale nous ont permis de nous rendre compte que des particules restaient en suspension, ce qui nous a amenés à réaliser une étape de lavages, avant observation, dans le but d’éliminer les particules qui n’auraient pas interagi avec le biofilm. Les lavages par introduction et retrait d’eau distillée stérile, sont réalisés délicatement pour éviter de décrocher la biomasse adhérente.

Filtration : Lorsqu’on introduit les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-A dans la solution, des agrégats sont observés (Figure IV.8), ce qui n’est pas étonnant puisque la mesure de potentiel zêta de ces particules en milieu aqueux est proche de zéro, et donc ces particules ont tendance à s’agréger. En plus de placer les particules dans un bain à ultra-sons pendant 30 minutes, nous avons opté pour la filtration en utilisant sur des filtres de porosité de 0,2 µm. Dans la suite, toutes les particules sont placées dans un bain à ultra-sons puis elles sont systématiquement filtrées avant l’introduction dans les biofilms.

La filtration des nanoparticules entraîne une rétention des particules sur le filtre, et donc la quantité réelle de nanoparticules que l’on introduit n’est pas maîtrisée. Dans tous les cas, cette

quantité est inférieure à celle initialement calculée, ceci nous a obligés à travailler à une concentration massique initiale à 0,05 mg/mL au lieu de 0,005 mg/mL.

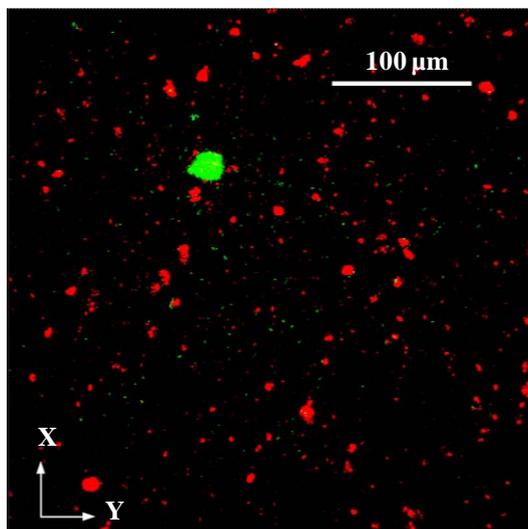


Figure IV.8 – Observation en microscopie confocale des particules $Ru(bpy-Si)@Si-A$ avec une concentration massique de 0,005 mg/mL passées aux bains à ultra-sons mais sans filtration.

- Cinétique de mise en contact des nanoparticules de silice luminescentes avec le biofilm par microscopie confocale (Figure IV.9) :

La cinétique de pénétration a été réalisée avec des nanoparticules de silice luminescentes non fonctionnalisées, $Ru(bpy-Si)@Si$, en condition statique. Les « snapshots » présentés en Figure IV.9 indiquent simultanément la fluorescence des bactéries et des nanoparticules. Les premières heures après l'introduction des nanoparticules, nous n'observons aucune pénétration de particules dans le biofilm. Les premières particules commencent à diffuser dans le biofilm au bout de 5 heures, mais ce n'est qu'au bout de 20 heures que nous observons des particules dans tout le biofilm, y compris dans les amas cellulaires. La cinétique est très lente du fait en partie que les expériences soient réalisées en absence de flux. En effet, dans le cas de particules inférieures à 100 nm, elles doivent diffuser dans le milieu pour atteindre le biofilm. Ce phénomène serait à l'origine des longs temps de pénétration des particules observés.

Au cours de ces expériences, nous avons observé le photoblanchiment du SYTO 9®. En conservant les paramètres d'acquisition, la différence d'émission est flagrante entre l'instant initial et au bout de 3 heures.

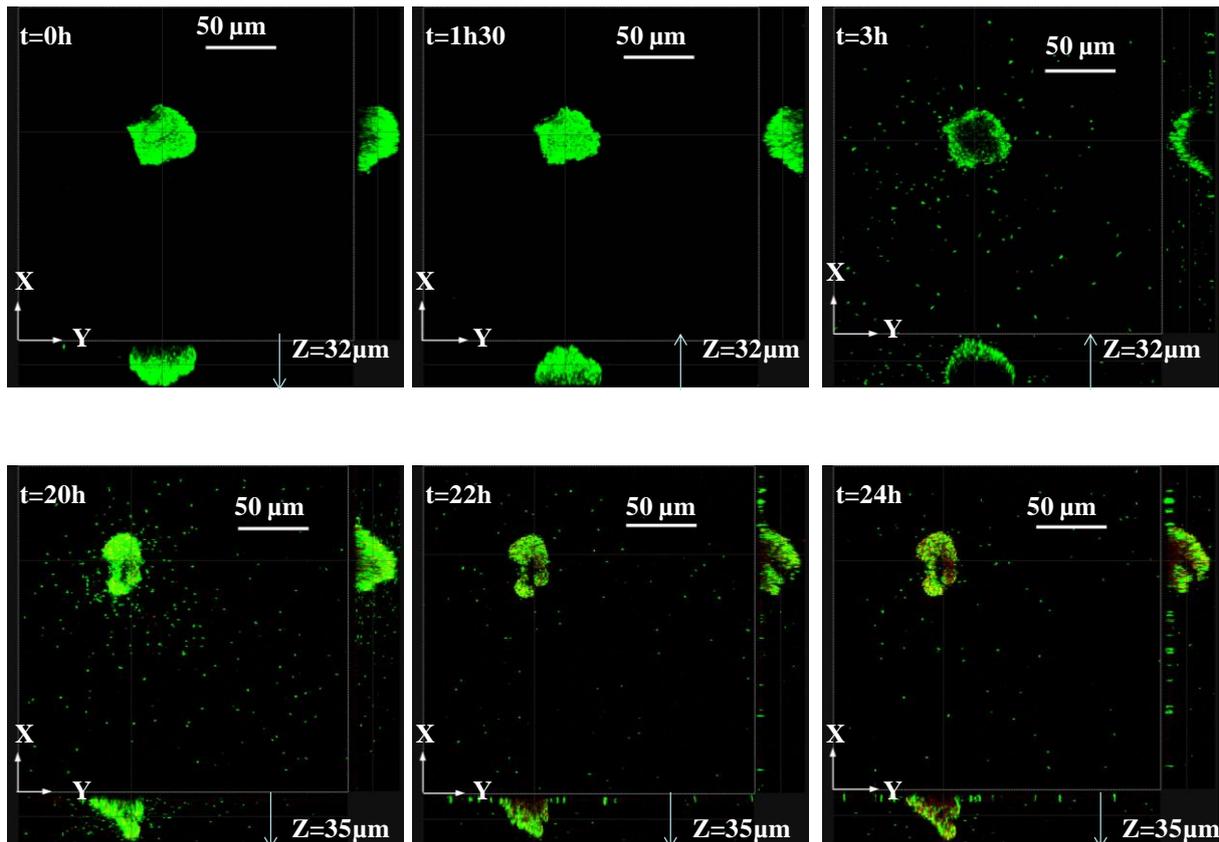


Figure IV.9 – Cinétique de pénétration des particules $Ru(bpy-Si)@Si$ dans le biofilm

Nous avons optimisé les conditions d'observation des nanoparticules dans les biofilms. Les conditions sélectionnées sont les suivantes :

- **Nanoparticules préalablement placées dans un bain à ultrasons pour séparation puis filtrées sur filtres dont la porosité est de 0,2 µm pour enlever les agrégats.**
- **Concentration en ruthénium : 10^{-5} M correspondant à une concentration massique en nanoparticules de 0,05 mg/mL.**
- **Temps de contact des particules avec le biofilm avant observation: 16 heures.**

3.2. Distribution spatiale des nanoparticules dans les biofilms

Dans le but de visualiser simultanément les bactéries, l'EPS et les nanoparticules de silice nous avons opté pour un triple marquage. Les conditions d'acquisition sont décrites dans le chapitre II. Les bactéries sont marquées par un marqueur bleu, le SYTO 45® ($\lambda_{exc} = 458$ nm et $\lambda_{em} = 468$ nm – 488 nm), l'EPS est marqué par un marqueur vert, la ConA-AlexaFluor®488 ($\lambda_{exc} = 488$ nm et $\lambda_{em} = 498$ – 533 nm) et les nanoparticules de silice luminescentes ($Ru(bpy-Si)@Si$ et $Ru(bpy-Si)@Si-X$) sont excitées à $\lambda_{exc} = 543$ nm et l'émission est collectée entre $\lambda_{em} = 600$ – 700 nm.

Dans cette partie nous avons déterminé la distribution spatiale des particules dans les biofilms en considérant les différentes propriétés de surface des nanoparticules de silice. Les études de pénétration des particules sont réalisées avec les nanoparticules de 25 nm et 68 nm. Un récapitulatif des particules fonctionnalisées que nous avons à disposition, classées selon leur caractère hydrophile/hydrophobe est présenté dans le Schéma IV.1.

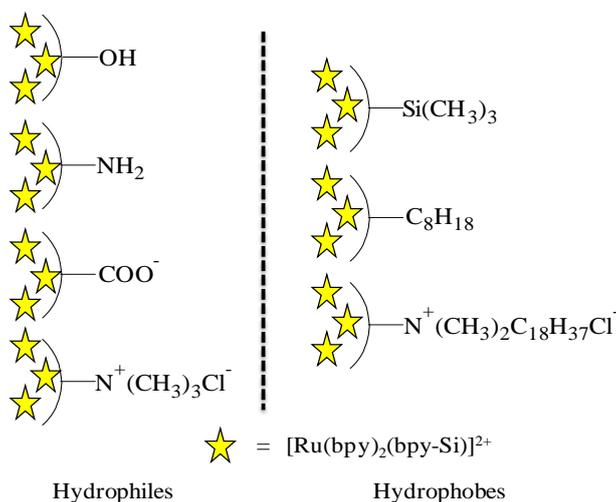
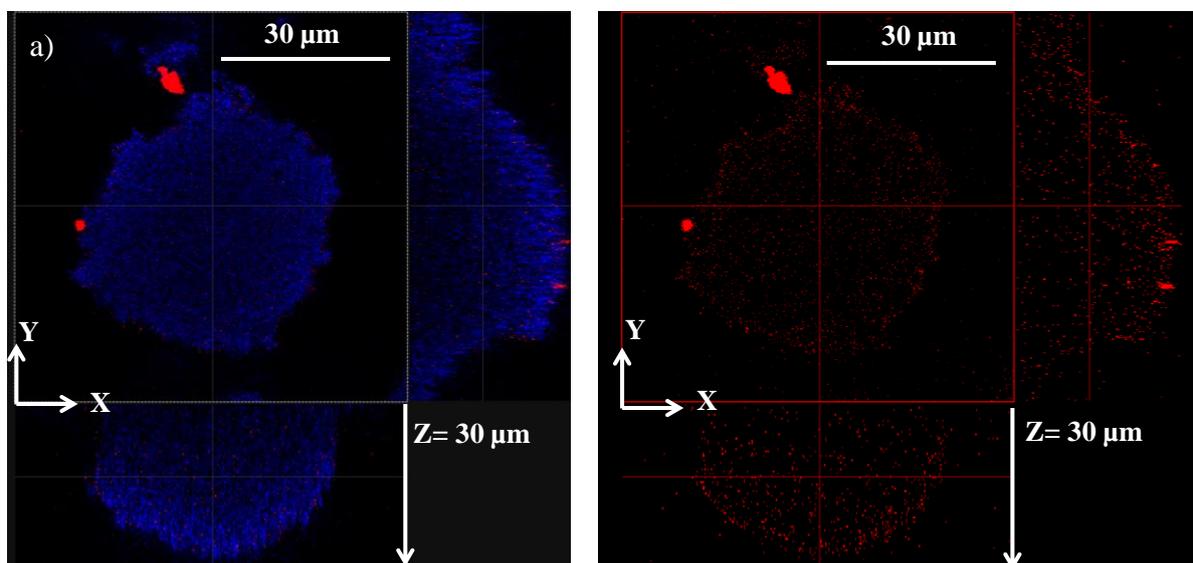


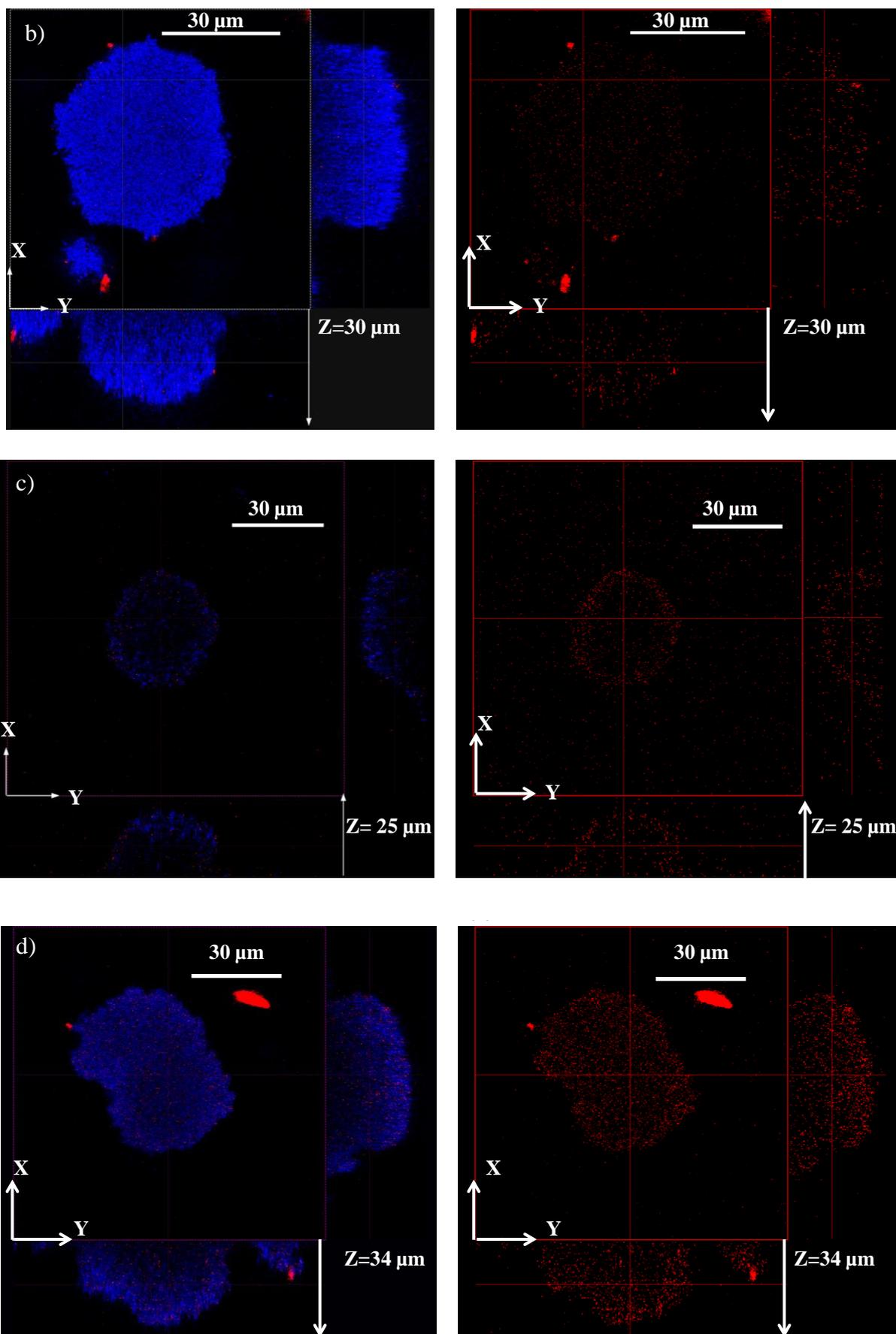
Schéma IV.1 – Particules de silice luminescentes classées selon leur caractère hydrophile/hydrophobe

3.2.1. Résultats

- Observations des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si et de Ru(bpy-Si)@Si-X de 25 nm par microscopie confocale (Figure IV.10)

Dans la Figure IV.10, les « snapshots » de gauche permettent de visualiser simultanément la fluorescence des bactéries (bleu) et des nanoparticules (rouge) et les clichés de droite permettent de visualiser uniquement la luminescence des nanoparticules.





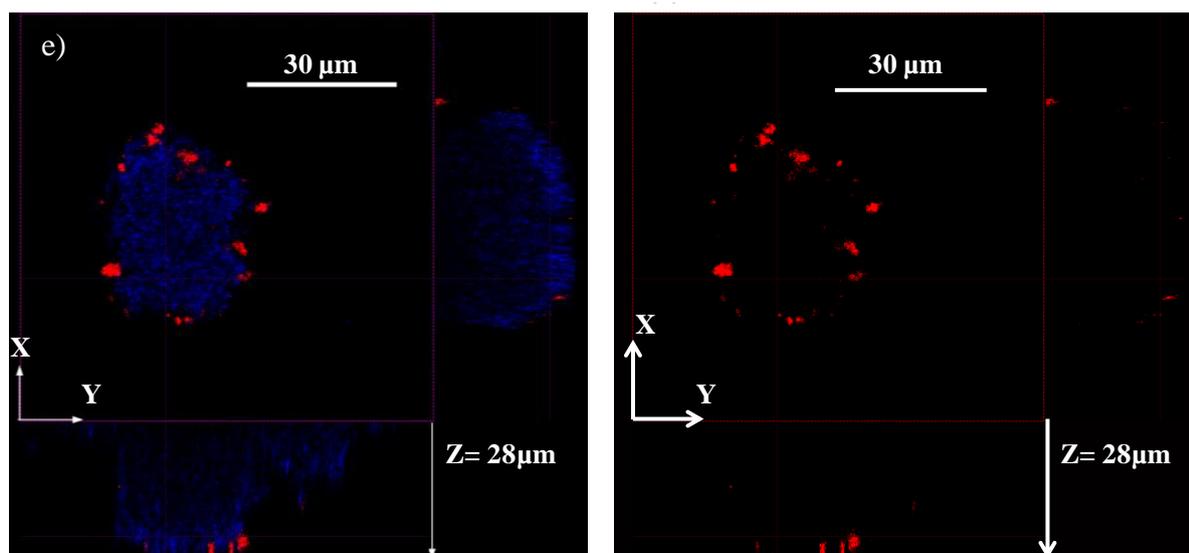


Figure IV.10 – Pénétration des particules de silice de 25 nm : a) $Ru(bpy-Si)@Si$; b) $Ru(bpy-Si)@Si-A$; c) $Ru(bpy-Si)@Si-B$; d) $Ru(bpy-Si)@Si-C$; e) $Ru(bpy-Si)@Si-E$ dans le biofilm à *P. aeruginosa*

Les particules hydrophiles $Ru(bpy-Si)@Si$, $Ru(bpy-Si)@Si-A$, $Ru(bpy-Si)@Si-B$ et $Ru(bpy-Si)@Si-C$ (Figure IV.10a-d) qu'elles soient chargées positivement ou négativement pénètrent dans tout le biofilm. Les coupes à différentes épaisseurs attestent de la présence des particules de la base au sommet du biofilm en annexe III à VI. Par contre, le comportement des particules $Ru(bpy-Si)@Si-E$ diffère de celui des nanoparticules hydrophiles $Ru(bpy-Si)@Si$, $Ru(bpy-Si)@Si-A$, $Ru(bpy-Si)@Si-B$ et $Ru(bpy-Si)@Si-C$ (Figure IV.10e). En effet nous pouvons noter que les particules sont localisées à la surface du biofilm sans pénétrer dans le biofilm. Ceci est bien mis en évidence par les coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm en annexe VII.

Pour faire une analyse plus fine de la distribution spatiale des nanoparticules de silice bifonctionnelles à l'intérieur du biofilm, nous avons utilisé le logiciel Image J. Nous avons tracé les intensités d'émission des différentes nanoparticules de silice bifonctionnelles en fonction de l'épaisseur du biofilm. Pour éviter de comptabiliser les particules qui seraient adsorbées à la surface du biofilm, nous avons choisi des zones de mesures (ROI) à l'intérieur du biofilm (annexe VIII). De plus, pour que la comparaison soit représentative, les ROI sélectionnées ont des surfaces identiques.

Nous estimons que cette évaluation est possible car dans le chapitre III, nous avons mis en évidence que l'intensité d'émission des particules hydrophiles est similaire. De plus les conditions d'acquisition des images sont identiques. Les graphes évaluant la luminescence et par conséquent la quantité de particules en fonction de l'épaisseur pour les nanoparticules non

fonctionnalisées Ru(bpy-Si)@Si et les particules fonctionnalisées Ru(bpy-Si)@Si-A, Ru(bpy-Si)@Si-B, Ru(bpy-Si)@Si-C et Ru(bpy-Si)@Si-E sont reportés dans la Figure IV.11. L'épaisseur des biofilms n'étant pas identique, pour comparer la pénétration des nanoparticules, nous avons normalisé l'épaisseur des biofilms 0 étant la base du biofilm et 1 le sommet du biofilm. A partir de ces graphes, nous pouvons observer trois effets :

Premièrement, la Figure IV.11 confirme que les particules Ru(bpy-Si)@Si-E, hydrophobes ne pénètrent pas à l'intérieur du biofilm.

Deuxièmement, en condition pseudo-statique, pour une mise en contact de 16 heures, les particules pénètrent bien dans tout le biofilm, mais la présence des particules est plus importante en se rapprochant de la surface des biofilms et cette observation est valable pour les quatre particules hydrophiles étudiées (Figure IV.10a-d et Figure IV.11).

Troisièmement, nous notons une nette différence d'intensité entre les particules Ru(bpy-Si)@Si-C (Figure IV.10d et Figure IV.11) et les autres particules, signifiant qu'une plus grande quantité de particules Ru(bpy-Si)@Si-C parvient à pénétrer dans le biofilm. Concernant les autres, le classement est assez proche et dans l'ordre de pénétration vient Ru(bpy-Si)@Si > Ru(bpy-Si)@Si-A > Ru(bpy-Si)@Si-B.

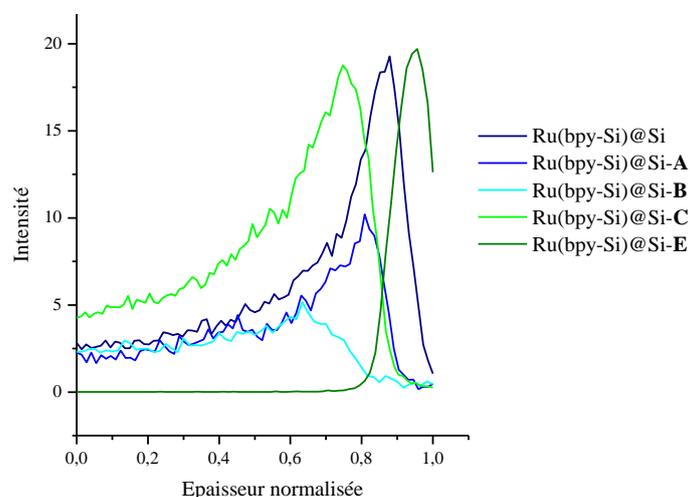
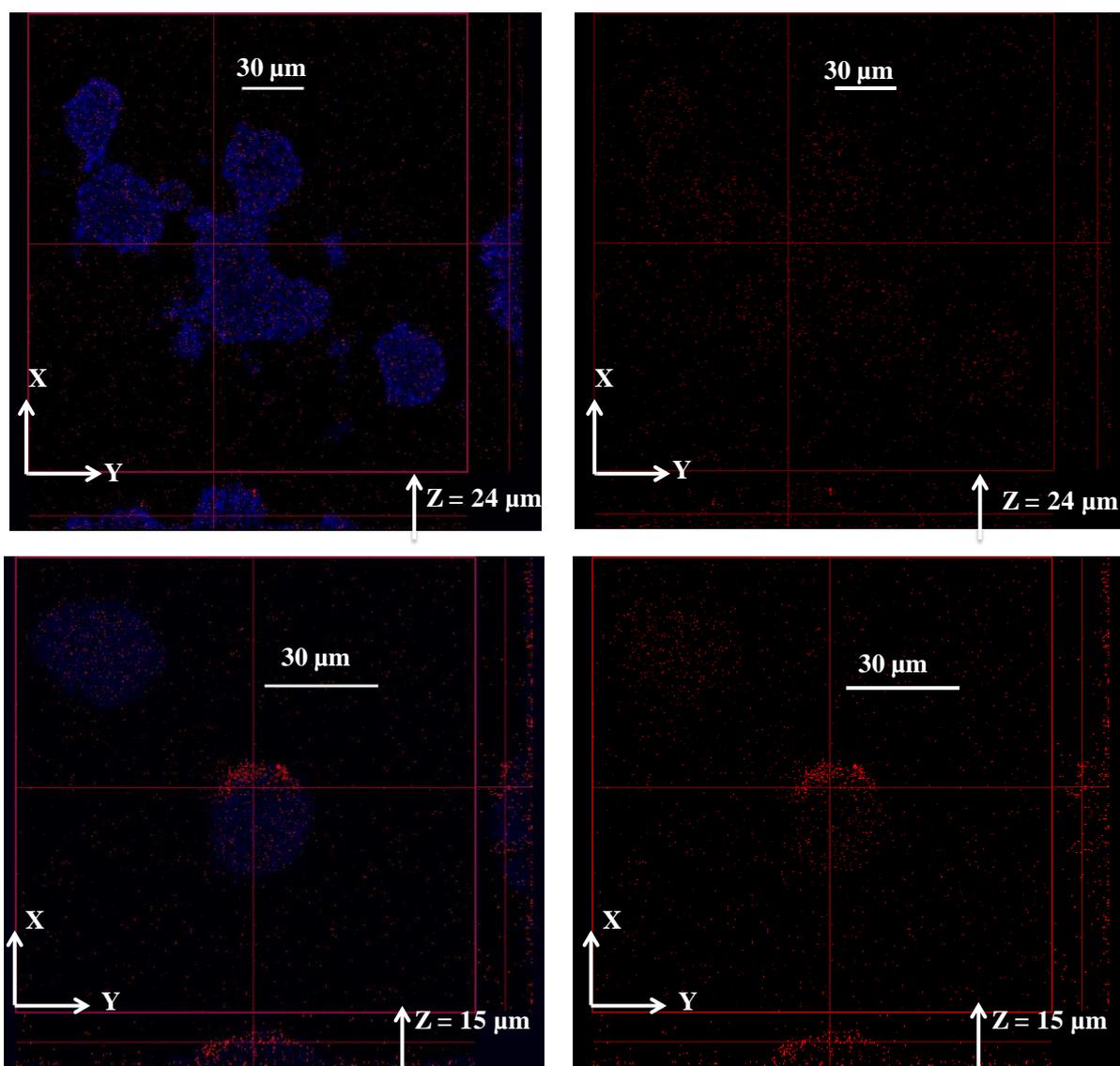


Figure IV.11 – Intensité de luminescence des nanoparticules de 25 nm en fonction de l'épaisseur normalisée du biofilm

- Observations des particules Ru(bpy-Si)@Si et de Ru(bpy-Si)@Si-X de 68 nm en microscopie confocale (Figure IV.12)

Dans la Figure IV.12, les « snapshots » de gauche permettent de visualiser simultanément la fluorescence des bactéries marquées par le SYTO45® (bleu, $\lambda_{em} = 468 \text{ nm} - 488 \text{ nm}$) et la luminescence des nanoparticules (rouge, $\lambda_{em} = 600 \text{ nm} - 700 \text{ nm}$) et les clichés de droite permettent de visualiser uniquement la luminescence des nanoparticules.



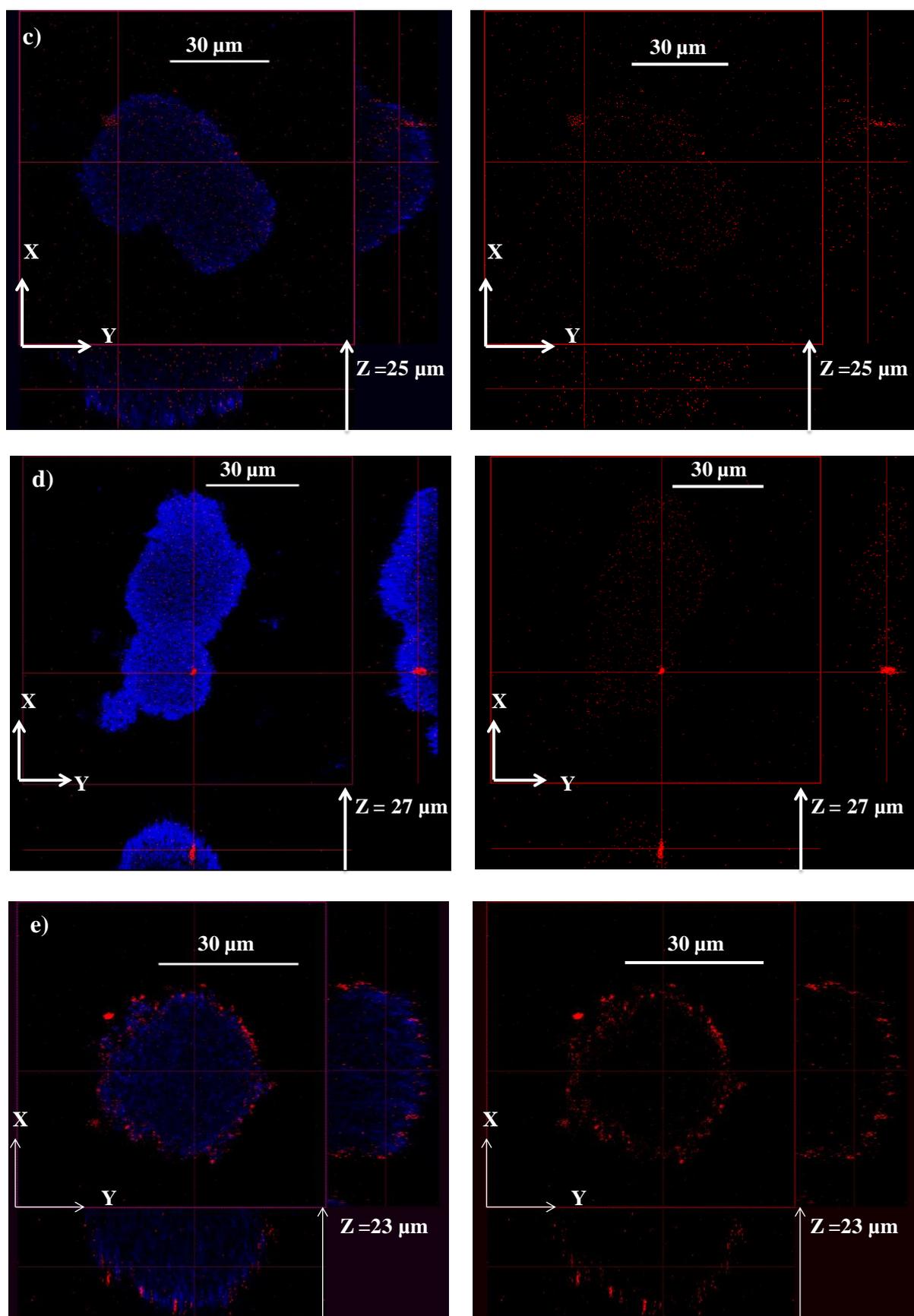


Figure IV.12 – Pénétration des particules de silice de 68 nm : a) $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si}$; b) $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-A}$; c) $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-B}$; d) $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-C}$; e) $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-E}$ dans le biofilm *P. aeruginosa*

Pour comparer la distribution spatiale des nanoparticules de 25 et 68 nm dans le biofilm, nous avons tracé l’intensité de luminescence des particules présentes dans les biofilms en fonction des épaisseurs normalisées de ces derniers. Les précautions prises (ROI de surfaces similaires) pour tracer les graphes obtenus pour les particules de 25 nm sont conservées pour les particules de 68 nm.

Les particules hydrophiles Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-**A**, Ru(bpy-Si)@Si-**B** et Ru(bpy-Si)@Si-**C** de 68 nm (Figure IV.12a-d et Figure IV.13a-d) pénètrent dans tout le biofilm, de la base au sommet. Des coupes en annexe IX à XII attestent de la présence des nanoparticules. Cependant en comparant les clichés de microscopie confocale (Figure IV.10a-d et Figure IV.12a-d) et le graphe en Figure IV.13a-d, on remarque une nette diminution de l’intensité des particules de 68 nm, notamment pour les particules Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-**B** et Ru(bpy-Si)@Si-**C** comparée aux mêmes nanoparticules comportant le même groupement fonctionnel et donc ayant les mêmes propriétés de 25 nm. Nous pouvons noter que dans le cas des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-**A**, elles pénètrent dans le biofilm mais une grande partie des particules est adsorbée sur la surface du biofilm (Figure IV.12b). Une représentation tridimensionnelle, en annexe Xb), permet de mieux se rendre compte qu’une partie des particules Ru(bpy-Si)@Si-**A** est absorbée sur le biofilm.

Les particules hydrophobes Ru(bpy-Si)@Si-**E** de 68 nm (Figure IV.10e), tout comme celles de 25 nm, ne pénètrent pas dans le biofilm et restent à la périphérie du biofilm, sous forme d’amas. Ceci est bien illustré Figure IV.12e et Figure IV.13e.

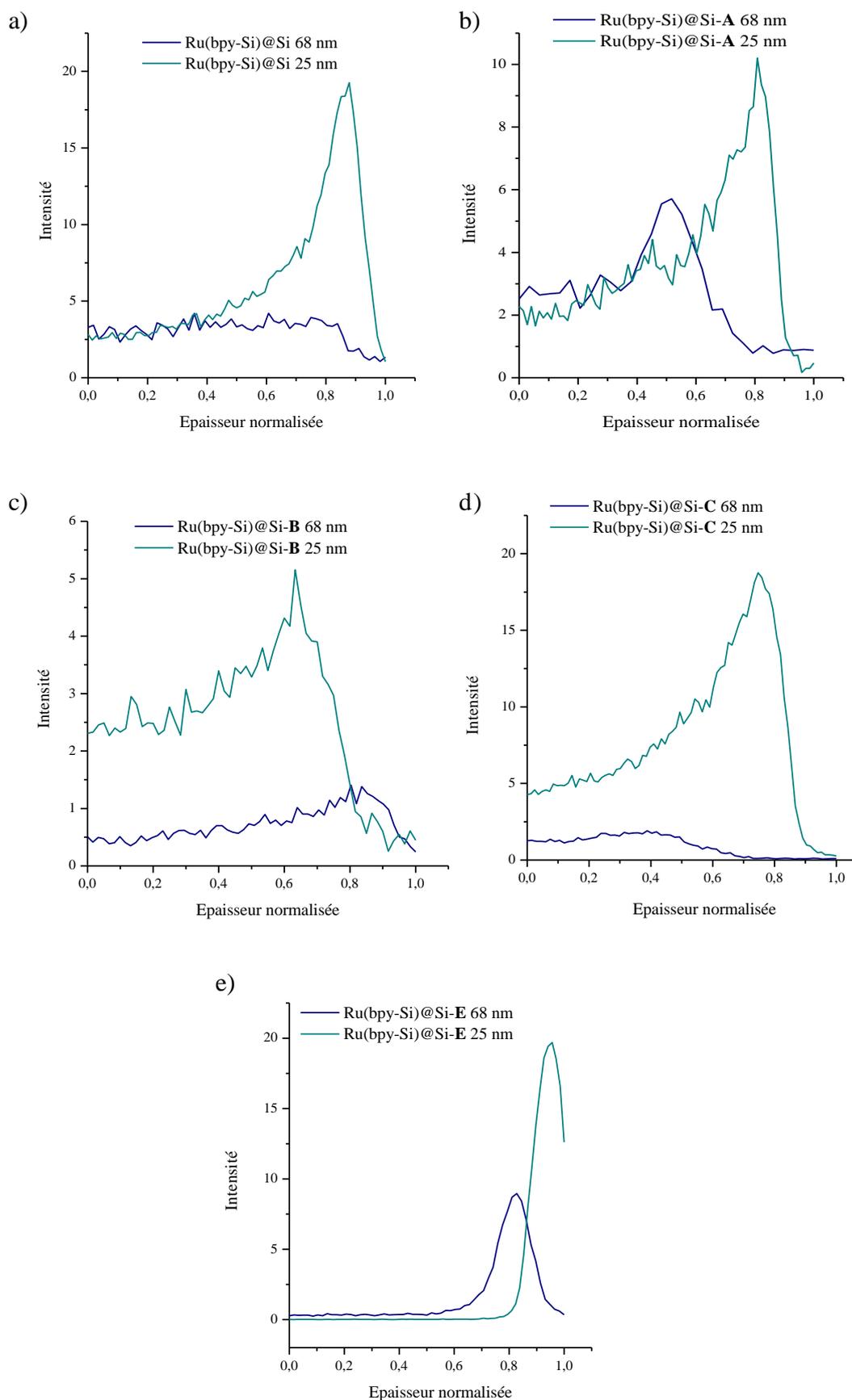


Figure IV.13 – Comparaison de l'intensité de luminescence des particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-X présentes dans le biofilm en fonction de leur taille; a) Ru(bpy-Si)@Si ; b) Ru(bpy-Si)@Si-A ; c) Ru(bpy-Si)@Si-B ; d) Ru(bpy-Si)@Si-C ; e) Ru(bpy-Si)@Si-E

3.2.2. Discussion

La microscopie confocale a permis de visualiser et de localiser les nanoparticules de silice bifonctionnelles dans les biofilms à *P. aeruginosa*. Les clichés de microscopie confocale (Figure IV.10 et Figure IV.12) montrent que quelle que soit la taille des particules, les nanoparticules hydrophiles Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A, Ru(bpy-Si)@Si-B et Ru(bpy-Si)@Si-C pénètrent dans tout le biofilm tandis que les nanoparticules hydrophobes Ru(bpy-Si)@Si-E restent à la périphérie du biofilm, et ce sur toute l'épaisseur du biofilm. Très récemment, Aldeek *et al.*³³ ont mis en évidence que des quantum dots hydrophobes restaient confinés dans des micro-domaines hydrophobes situés à la périphérie d'un biofilm à *S. oneidensis*. Bien que nous travaillions sur des biofilms à *P. aeruginosa* avec des outils différents, Ru(bpy-Si)@Si-E, l'observation de zones hydrophobes dans les biofilms se confirme.

En utilisant le logiciel Image J, des informations plus fines sur la distribution spatiale des nanoparticules dans le biofilm sont apportées, en examinant l'intensité de fluorescence des nanoparticules à l'intérieur du biofilm (Figure IV.11 et Figure IV.13). En plus de constater une différence flagrante de comportement entre les particules hydrophiles et hydrophobes, nous notons des différences de comportement entre les particules hydrophiles. Dans le cas où le diamètre des particules est de 25 nm, les nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-C, ayant un groupement ammonium quaternaire greffé à la surface, pénètrent en plus grande quantité dans le biofilm que les autres particules hydrophiles Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A et Ru(bpy-Si)@Si-B, malgré le fait que leur caractère hydrophile soit comparable. En effet les mesures d'angle de contact compris entre 31-38° et les mesures de Log P compris entre -0,73 et -0,84 sont très proches. Le caractère hydrophile seul ne peut pas donc pas expliquer la différence de comportement des particules hydrophiles. Ces informations suggèrent que la fonctionnalisation des particules est un facteur clé dans la localisation et la pénétration des particules dans les biofilms.

La composition de l'EPS pourrait expliquer la répartition des particules au sein du biofilm. L'EPS étant globalement hydrophile, les particules hydrophiles parviennent à pénétrer et diffuser dans le biofilm. En plus d'être hydrophiles, les biofilms *P. aeruginosa* sont globalement chargés négativement, de ce fait des interactions électrostatiques existent. Parmi les quatre particules hydrophiles utilisées, l'attraction électrostatique des particules Ru(bpy-Si)@Si-C ($\zeta = 43$ mV) vis-à-vis de l'EPS est la plus importante, ce qui pourrait expliquer que ces particules pénètrent mieux que les autres particules. Cependant Guiot *et al.*⁴⁴ ont montré

par des mesures de diffusion en spectroscopie de corrélation de fluorescence que les particules cationiques, et notamment des particules de latex possédant des groupements amine, ne parviennent pas à diffuser dans le biofilm à cause des interactions électrostatiques.

La cohésion du biofilm, qui est principalement constitué d'eau, s'explique par le pontage de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) et de présence de zones hydrophobes. Dans les biofilms à *P. aeruginosa*, nous avons localisé ces micro-domaines hydrophobes à la périphérie du biofilm formant une sorte de « dôme ».

La taille des sondes affecte la pénétration dans les biofilms. Bien que la différence de taille ne soit pas très importante entre les nanoparticules utilisées (25 et 68 nm) pour l'exploration des biofilms à *P. aeruginosa*, les particules de 68 nm pénètrent dans tout le biofilm mais elles pénètrent moins que les particules de 25 nm, ceci fait intervenir un effet stérique (Figure IV.13). Contrairement aux particules de 25 nm, ce sont les interactions stériques qui prévalent. Des études^{34,44} ont déjà souligné l'importance de la taille des particules dans la pénétration des biofilms. Les particules de plus petites tailles pénètrent plus facilement le biofilm.

L'intérêt de la fonctionnalisation est double. Ces fonctionnalisations ont mis en évidence que les interactions des particules avec les biofilms sont guidées par des interactions physico-chimiques et des encombrements stériques. Le second intérêt de la fonctionnalisation est de pouvoir atteindre la membrane des cellules, grâce à des choix judicieux de molécules à greffer à la surface des particules.

Au vu des bons résultats de pénétration obtenus avec les particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-C}$, ils nous a semblé intéressant d'étudier le comportement de particules fonctionnalisées par la molécule **D** qui est un antibactérien¹¹¹, ce qui nous a menés vers la synthèse des particules $\text{Ru}(\text{bpy-Si})@\text{Si-D}$. Ainsi par le biais des nanoparticules luminescentes nous souhaitons visualiser la pénétration de cet agent antimicrobien dans le biofilm. Cependant nous ne sommes pas parvenus à explorer les biofilms avec ces particules suite à des problèmes de filtration rencontrés lors de la préparation des solutions.

4. Conclusion

Pour cette étude, il était important de travailler avec des biofilms riche en EPS, car la matrice extracellulaire d'exopolymères est souvent soupçonnée d'être responsable de la résistance des bactéries. Dans un premier temps, nous avons fait le choix de travailler avec le

milieu bouillon biofilm modifié (BBM), milieu synthétique et faiblement nutritif, qui conduit à la formation de biofilms en forme de champignons, produisant une quantité importante d'EPS.

Comme à notre connaissance, les nanoparticules de silice n'ont jamais été utilisées pour étudier les biofilms à *P. aeruginosa*, nous avons tout d'abord réalisé des tests de cytotoxicité avec les particules de 25, 48 et 68 nm dont la concentration massique est fixée à 0,5 mg/mL. Lors de ces tests, nous avons vérifié que l'architecture des biofilms était conservée et que la viabilité des bactéries n'était pas altérée par le marquage avec l'iodure de propidium. Pour les nanoparticules de 48 et 68 nm, nous avons déterminé, par dénombrement des UFC, que la concentration maximale en nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si est de 0,5 mg/mL pour éviter toute activité antibactérienne et/ou anti-biofilm sur le biofilm.

Avant d'explorer les biofilms avec les particules Ru(bpy-Si)@Si et Ru(bpy-Si)@Si-X, il a fallu optimiser de façon à avoir des résultats reproductibles. Ainsi les particules ont été placées dans un bain à ultra-sons puis elles ont été filtrées avec un filtre de porosité de 0,2µm, la concentration massique a été fixée à 0,05 mg/mL et le temps de contact est fixé à 16 heures.

La microscopie confocale a permis de visualiser la distribution spatiale des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A, Ru(bpy-Si)@Si-B, Ru(bpy-Si)@Si-C et Ru(bpy-Si)@Si-E de 25 et 68 nm dans les biofilms à *P. aeruginosa* par l'analyse des clichés, des représentations tridimensionnelles et notamment des coupes à différentes épaisseurs du biofilm. Nous avons noté un effet de taille sur la pénétration ; les particules de 25 nm pénètrent en plus grand nombre que les particules de 68 nm. Pour les tailles de 25 et 68 nm, les particules hydrophobes Ru(bpy-Si)@Si-E fonctionnalisées par l'hexaméthylsilazane ne pénètrent pas dans le biofilm, elles restent localisées à la surface des biofilms. Les particules hydrophiles se comportent différemment, elles parviennent à pénétrer dans tout le biofilm et ce quelle que soit la taille des particules. Toutefois, parmi les particules hydrophiles, Ru(bpy-Si)@Si-C fonctionnalisées par un chlorure de triméthylammonium pénètrent dans le biofilm mieux que les autres particules. Suivent ensuite les particules Ru(bpy-Si)@Si, Ru(bpy-Si)@Si-A fonctionnalisées par des groupements amine et Ru(bpy-Si)@Si-B fonctionnalisées par des groupements carboxylate. Ces informations suggèrent que la fonctionnalisation des particules est un facteur clé dans la localisation et la pénétration des particules dans les biofilms.

Conclusions et Perspectives

Les biofilms sont à l'origine de nombreux problèmes tant sur le plan médical qu'économique. Ils sont constitués d'une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice d'exopolymères (EPS) adhérant à une surface. Ce mode de vie confère de nombreux avantages aux bactéries et notamment une plus grande résistance vis-à-vis de nombreux traitements chimiques. Cette résistance est liée à un consortium de facteurs mais une des raisons souvent avancée est la limitation de la pénétration et de la diffusion de molécules au sein du biofilm. Peu de travaux ont porté sur la pénétration et la distribution spatiale de particules au sein de biofilms. L'alternative innovante que nous avons proposée dans ce travail est d'utiliser les nanoparticules de silice en tant qu'outils d'exploration.

La première partie des recherches concerne la synthèse des nanoparticules de silice luminescentes, dont les propriétés de luminescence sont apportées par incorporation d'un nouveau complexe de ruthénium, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$. Cette incorporation a été possible du fait de la bonne solubilité de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-Si})]\text{Cl}_2$ dans l'eau. Ces nanoparticules de silice ont été synthétisées par la méthode de Stöber en microémulsion inverse. Par la suite, nous avons étudié la formulation de la microémulsion quaternaire, tout d'abord, puis ternaire de façon à moduler la taille des nanoparticules tout en gardant des nanoparticules très monodisperses. Des particules allant de 25 à 68 nm ont été synthétisées.

La seconde partie des travaux consiste à fonctionnaliser ces nanoparticules de silice luminescentes par des organoalkoxysilanes choisis pour les propriétés de surface qu'ils apportent (caractère hydrophile, hydrophobe, cationique ou anionique). Nous avons opté pour une réaction de greffage en milieu anhydre où les réactions d'hydrolyse et de condensation sont maîtrisées. Nous avons travaillé au reflux de l'acétonitrile pour augmenter la réactivité des organoalkoxysilanes et la quantité introduite d'organosilane (Ω) est égale à 2 mmol.g^{-1} . Ces conditions ont permis d'obtenir des nanoparticules fonctionnalisées en monocouche à la surface. Les taux de greffage obtenus, déterminés principalement par analyse élémentaire, sont compris entre 0,11 et $1,00 \text{ mmol.g}^{-1}$. Des faibles taux de greffage sont obtenus pour l'octyltriéthoxysilane et pour le N-(3-triméthoxysilylpropyl)ethylenediaminetriacétate de sodium, dus à l'encombrement stérique. Le taux élevé du greffage dans le cas du 3-aminopropytriéthoxysilane s'explique par le fait que la réaction de greffage est auto-catalysée par la présence de la fonction amine.

Dans les deux premières parties, nous nous sommes appliqués à caractériser les nanoparticules de silice bifonctionnelles, luminescentes et chimiquement modifiées en surface. La structure moléculaire du complexe lors de l'incorporation ainsi que l'intégrité chimique des organosilanes greffés ont été conservées et confirmées grâce aux techniques de spectroscopie (DRIFT, RMN CP MAS ^{13}C , XPS). La RMN CP MAS du silicium est la seule technique nous permettant d'affirmer que les organoalkoxysilanes sont greffés de façon covalente aux nanoparticules de silice.

Les propriétés de luminescence des nanoparticules de silice en solution sont exaltées par rapport à celle du complexe libre.

Le but de cette thèse étant de montrer que les nanoparticules de silice luminescentes peuvent être un nouvel outil pour l'étude des biofilms, nous avons évalué la pénétration et la localisation des différentes nanoparticules de silice grâce à la microscopie confocale. L'intérêt majeur de la microscopie confocale est la possibilité de faire des coupes optiques nettes à différentes épaisseurs de l'échantillon ce qui permet la reconstitution des images en trois dimensions. De plus l'observation se fait sur des biofilms « vivants ». Ces travaux constituent les toutes premières utilisations des nanoparticules de silice luminescentes en parallèle de l'étude menée par Hidalgo *et al.*³⁴

Dans nos conditions expérimentales (biofilm de 3 jours, temps de contact 16 h, condition pseudo-statique), nous avons montré plusieurs effets :

- La gamme des particules que nous avons à disposition, de 25 à 68 nm, est adaptée pour l'étude de biofilms à *P. aeruginosa* puisque un effet de taille est observé pour les particules hydrophiles ayant une même fonctionnalité, les particules de 25 nm pénétrant toujours plus que les particules de 68 nm.
- Dans le cas des particules de 25 nm, les particules hydrophiles pénètrent dans la totalité du biofilm du sommet à la base. Cependant les particules sont en plus grand nombre vers le sommet du biofilm soulignant une limitation de transfert. Bien que les particules hydrophiles parviennent à pénétrer tout le biofilm, les comportements diffèrent selon la nature chimique de la fonction à la surface des nanoparticules. Parmi les groupements de surface étudiés, les particules ayant un groupement ammonium quaternaire avec une courte chaîne ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$) montrent une excellente pénétration au sein du biofilm. Un ordre de pénétration selon la fonctionnalité en surface a pu être

établi : $N(CH_3)_3^+Cl^- > OH > NH_2 > COO^-Na^+$. Le caractère hydrophile de ces particules étant proche, cette hiérarchie dans la pénétration des nanoparticules renforce l'idée que la distribution spatiale dans le biofilm est gouvernée par les interactions chimiques entre l'EPS et la surface des nanoparticules.

- Les particules hydrophobes ($-Si(CH_3)_3$), quant à elles, ne pénètrent pas dans le biofilm. Ces particules restent confinées à la surface des biofilms, formant une sorte de dôme, et ce quelle que soit la taille des particules. Ce comportement permet de localiser les micro-domaines hydrophobes situés la surface du biofilm. Le fait que les particules hydrophobes de 25 nm ne pénètrent pas dans le biofilm confirme que l'interaction chimique prédomine le facteur stérique puisque les particules hydrophobes ne parviennent pas à circuler dans le biofilm.

L'ensemble de ces travaux a montré que les nanoparticules de silice bifonctionnelles constituaient des sondes de choix pour l'exploration par microscopie confocale des biofilms. Par un choix judicieux des organosilanes présents à la surface et de la taille des nanoparticules de silice, nous avons montré que les particules interagissent différemment avec les biofilms.

En perspective de ce travail, des études de cinétique plus longues (supérieures à 16 heures) devraient permettre de suivre l'évolution de la pénétration des particules au cours du temps et de définir si les particules restent dans les microcolonies, ou si elles vont se déposer à la base du biofilm ou encore si les particules parviennent à atteindre les bactéries ce qui permettraient des traitements antimicrobiens.

Il serait intéressant d'étudier la diffusion de ces nanoparticules de silice bifonctionnelles par des mesures de diffusion au sein des biofilms en utilisant soit la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) soit la microscopie par retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

Nous proposons d'étendre l'utilisation des nanoparticules bifonctionnelles sur d'autres biofilms (bactériens ou non) pour généraliser l'intérêt de ce nouvelles sondes.

Enfin, dans l'optique de traiter plus efficacement les biofilms néfastes, des fonctionnalisations plus spécifiques permettant d'atteindre une cible bactérienne définie pourront être employées.

Wang *et al.*⁵² ont pu détecter de façon très précise la bactérie *E. coli* en greffant à la surface des particules un anti-corps spécifique de cette dernière. En combinant ce marquage spécifique avec les caractéristiques de vecteurs et de réservoirs des nanoparticules de silice, il serait possible de libérer de façon très localisée, de fortes concentrations d'antimicrobiens, pouvant rendre plus efficaces les traitements chimiques actuels contre les biofilms.

Annexes

Annexe I : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes SYTO9®, SYTO 45®, ConA-AlexaFluor®488, ConA-AlexaFluor®633, IP (Molecular probes, Invitrogen)

➤ SYTO9®

Le SYTO9® est un marqueur d'ADN et d'ARN qui présente une fluorescence exacerbée dans le vert quand il est lié à l'ADN et/ou ARN. Sa longueur d'onde d'excitation maximale est $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$ et émet de 460 à 575 nm avec un maximum d'émission à 498 nm.

Quelques caractéristiques du SYTO9® sont présentées ci-dessous :

- Perméable à toutes les cellules, incluant les cellules des mammifères et des bactéries
- Coefficient d'extinction molaire élevé $> 50,000 \text{ L. cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
- Rendement quantique $< 0,01$ quand il n'est pas lié à l'ADN et/ou l'ARN
- Rendement quantique $> 0,4$ quand le SYTO9® est lié à l'ADN/ARN

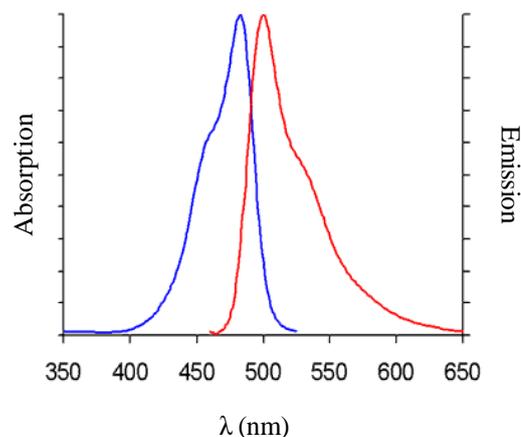


Figure 1 – Spectre d'excitation et d'émission du SYTO9®

➤ SYTO45®

Le SYTO45® est un marqueur d'ADN et d'ARN qui présente une fluorescence exacerbée dans le bleu quand il est lié à l'ADN et/ou ARN. Sa longueur d'onde d'excitation maximale est $\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$ et émet de 470 à 550 nm avec un maximum d'émission à 484 nm. Les caractéristiques sont les mêmes que SYTO9®.

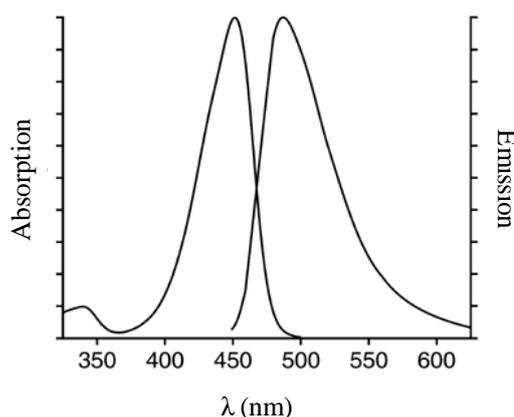
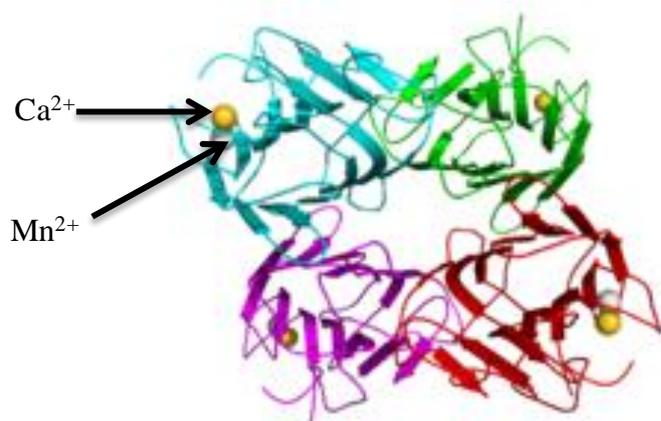


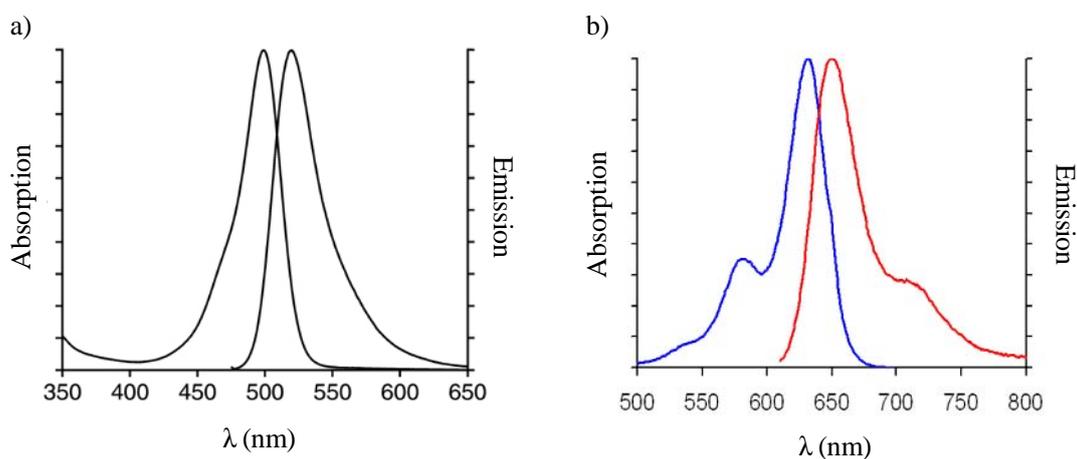
Figure 2 – Spectre d'excitation et d'émission du SYTO45®

➤ **ConA-AlexaFluor®488 et ConA-AlexaFluor®633**

La Concanavaline A (ConA) est une lectine qui se lie de façon spécifique aux résidus α -mannopyranosyl et α -glucopyranosyl. Une lectine est une protéine qui se lie à des carbohydrates. Comme la majorité des lectines, la ConA est un tétramère: chaque sous-unité (de 26.5KDa, 237 acides aminés fortement glycosylée) lie deux atomes, un Ca^{2+} et un métal de transition (généralement du Mn^{2+}). Le poids moléculaire est de 104-113 KDa.

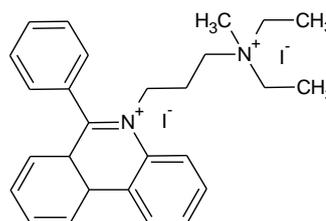
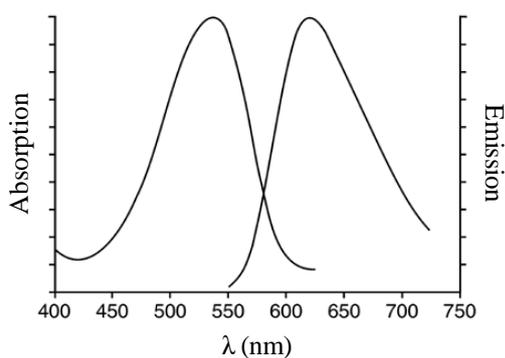


La longueur d'onde d'excitation maximale de ConA-AlexaFluor®488 est $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ et émet de 470 à 650 nm avec un maximum d'émission à 519 nm et la longueur d'onde d'excitation maximale de ConA-AlexaFluor®633 est $\lambda_{\text{exc}} = 632 \text{ nm}$ et émet de 600 à 800 nm avec un maximum d'émission à 647 nm ConA-AlexaFluor®633.



➤ Iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN ou ARN). Il s'intercale entre les paires de base d'ADN avec une stœchiométrie de 1 IP pour 4-5 paires de base d'ADN. L'IP est une molécule fluorescente ayant une masse moléculaire de 668,403 Da. L'iodure de propidium est couramment utilisé comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la mort cellulaire), en d'autres termes des cellules mortes ou endommagées.

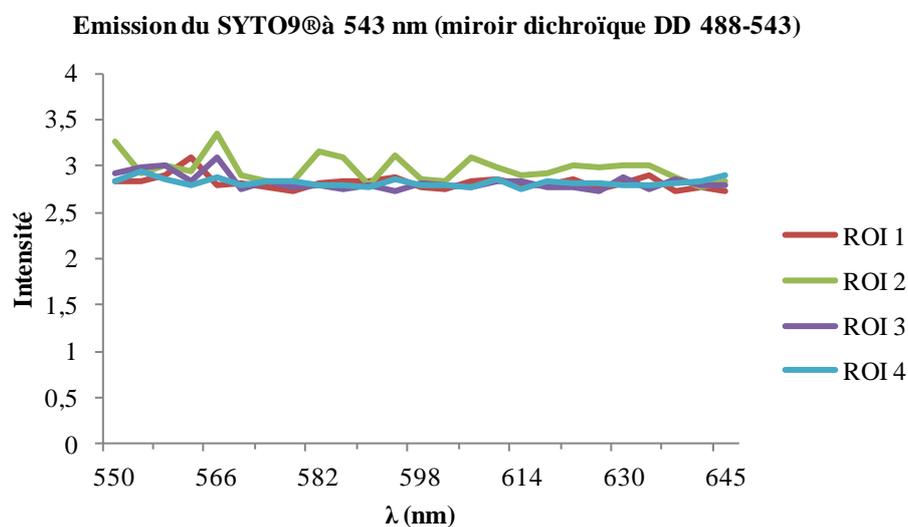
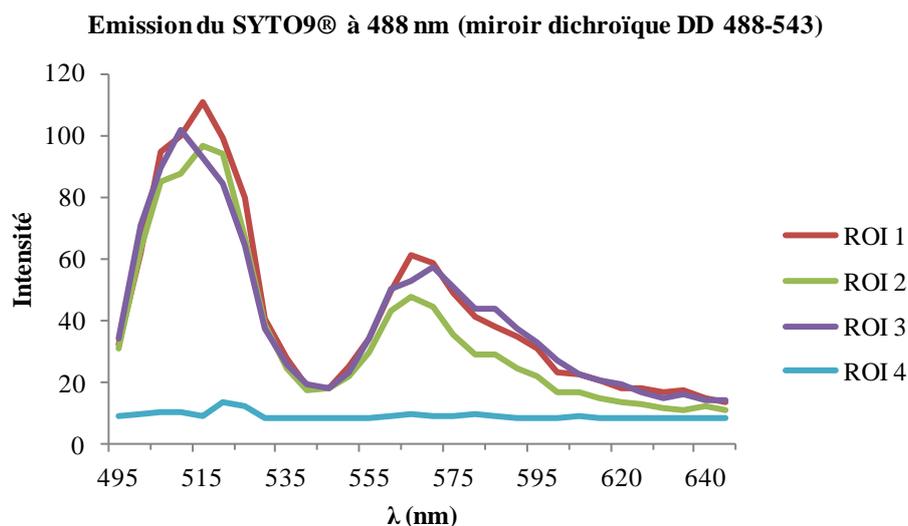


Nom commercial : Iodure de propidium (IP)

Nom IUPAC : 5-[3-(diéthylméthylammonio)propyl]-6-phénylphénantridinium

Annexe II : Débordements

Lors des doubles ou triples marquages, nous devons nous assurer que l'émission des marqueurs que nous observons n'est pas le résultat du débordement d'un autre marqueur dans cette zone d'émission. Ici est reporté l'exemple du marquage des bactéries par le SYTO9® (fenêtre d'émission : 460-650 nm) et des nanoparticules de silice luminescentes (fenêtre d'émission 550-800 nm). Cette vérification est faite systématiquement.



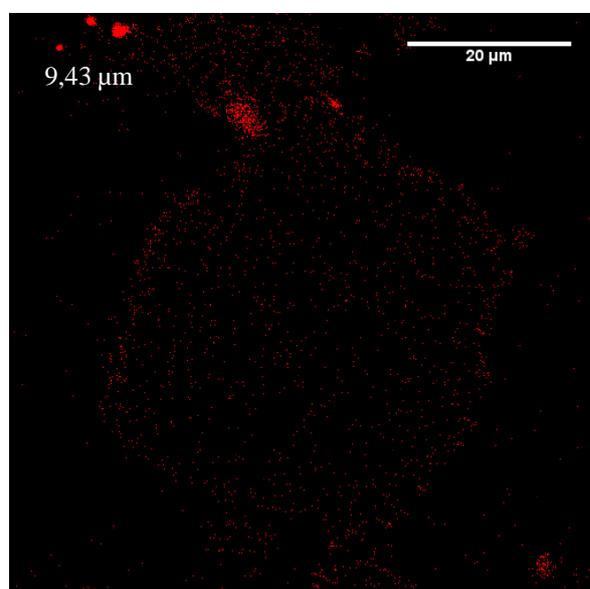
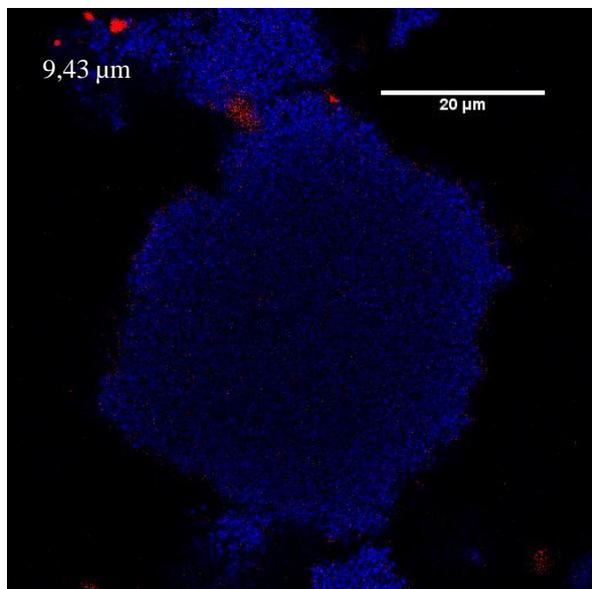
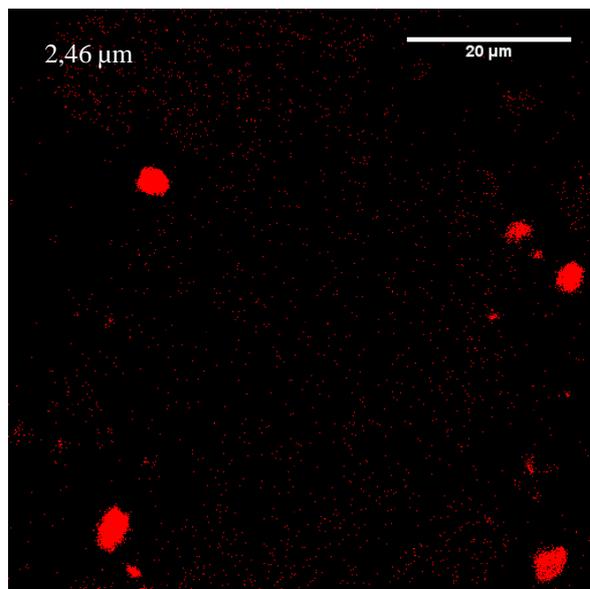
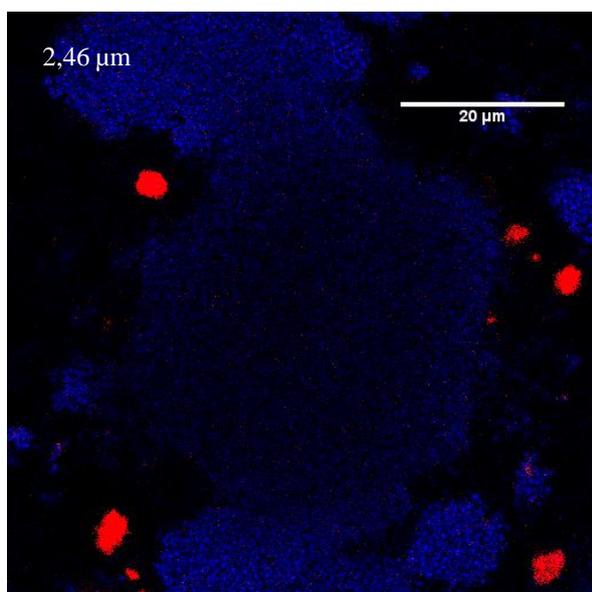
Avec le microscope confocal, nous avons tracé les spectres d'émission du SYTO9® à deux longueurs d'onde d'excitation à 488 nm et 543 nm, à quatre ROI différentes. Les trois premières ROI sont placées à différents endroits dans le biofilm et le ROI 4 est une zone en dehors du biofilm, n'étant pas marquée par le SYTO9®. Nous notons que pour une excitation à 488 nm, le SYTO9® présente deux maxima d'émission à 515 nm et 570 nm. Dans ces conditions, il y a un débordement du SYTO9® dans le rouge. Par contre lors d'une excitation

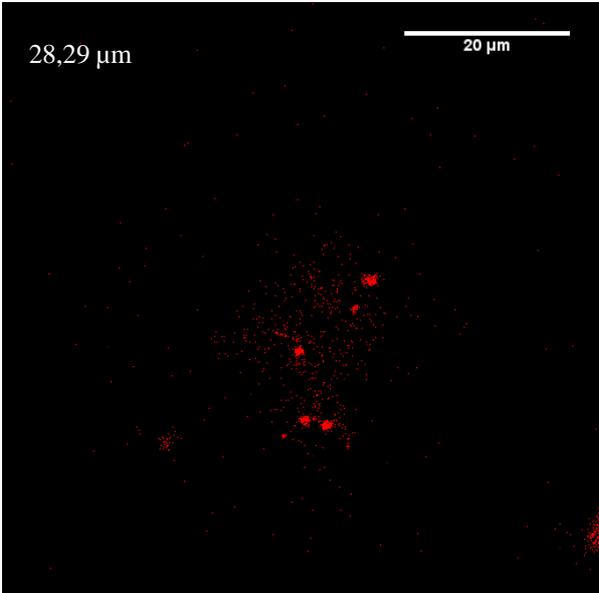
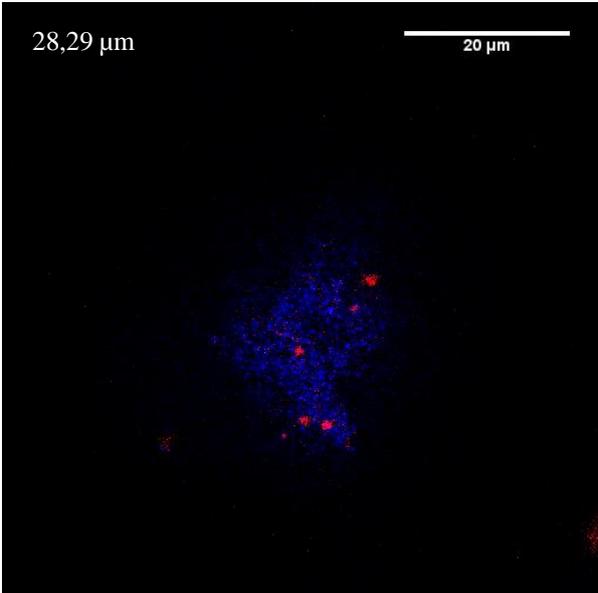
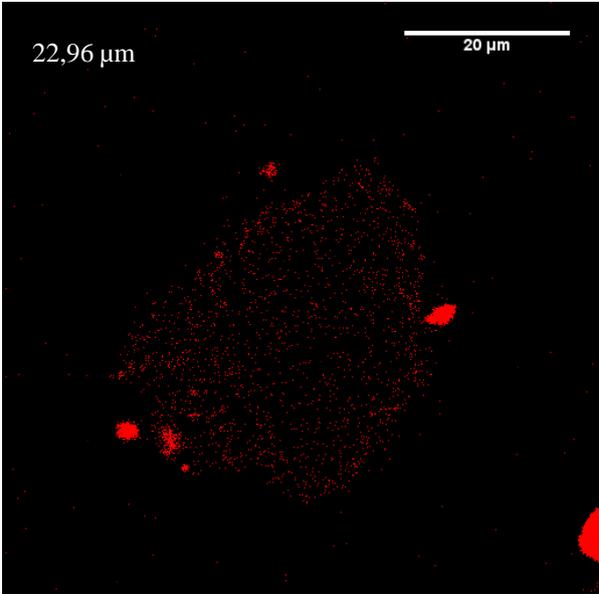
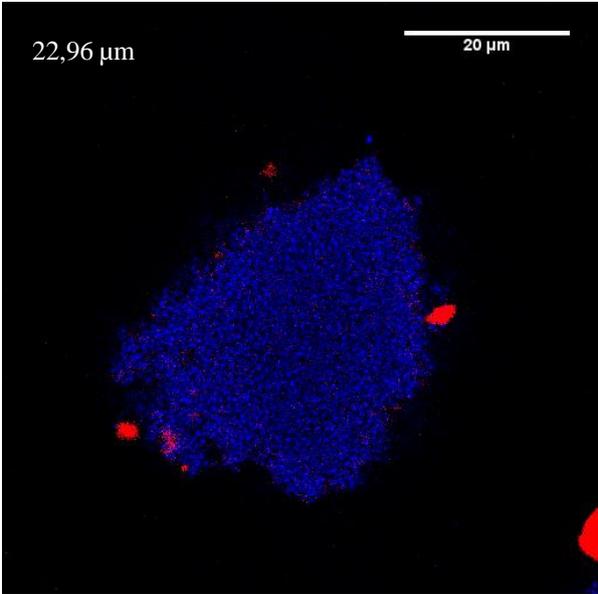
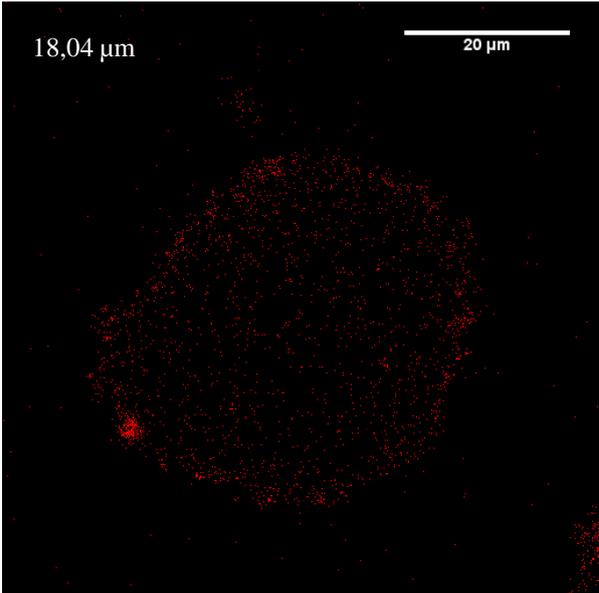
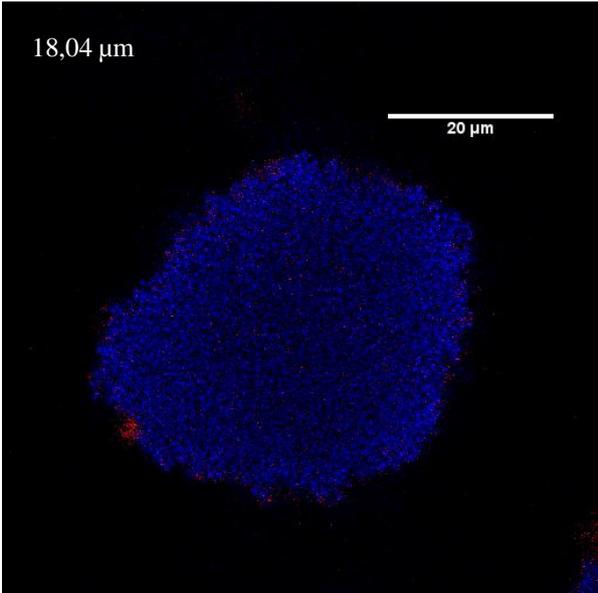
à $\lambda_{exc} = 543$ nm, le SYTO9® n'émet plus. La fluorescence détectée est du bruit de fond puisque la zone ROI est une zone exempte de SYTO9®.

Ainsi nous nous sommes assurés que lorsque nous excitons le SYTO9® ou la ConA-AlexaFluor®488 à $\lambda_{exc} = 488$ nm et que les nanoparticules luminescentes sont excitées à $\lambda_{exc} = 543$ nm, les deux marqueurs ne débordent pas dans la zone d'émission des nanoparticules de silice évitant ainsi de fausser les observations.

Annexe III : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si de 25 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

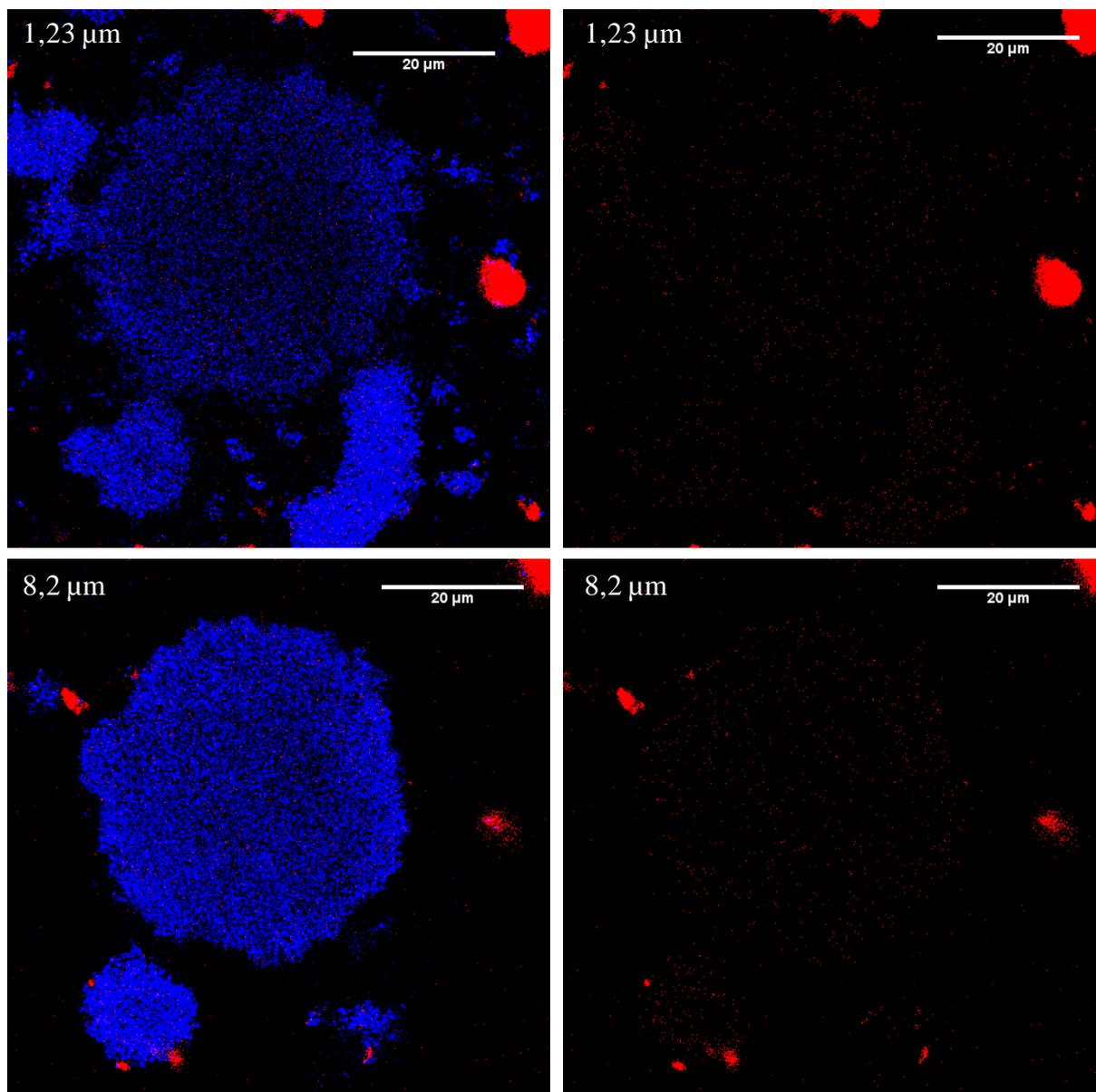
Les clichés de gauche sont la superposition de la fluorescence du SYTO45® (les bactéries) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si et les clichés de droite sont la luminescence des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si.

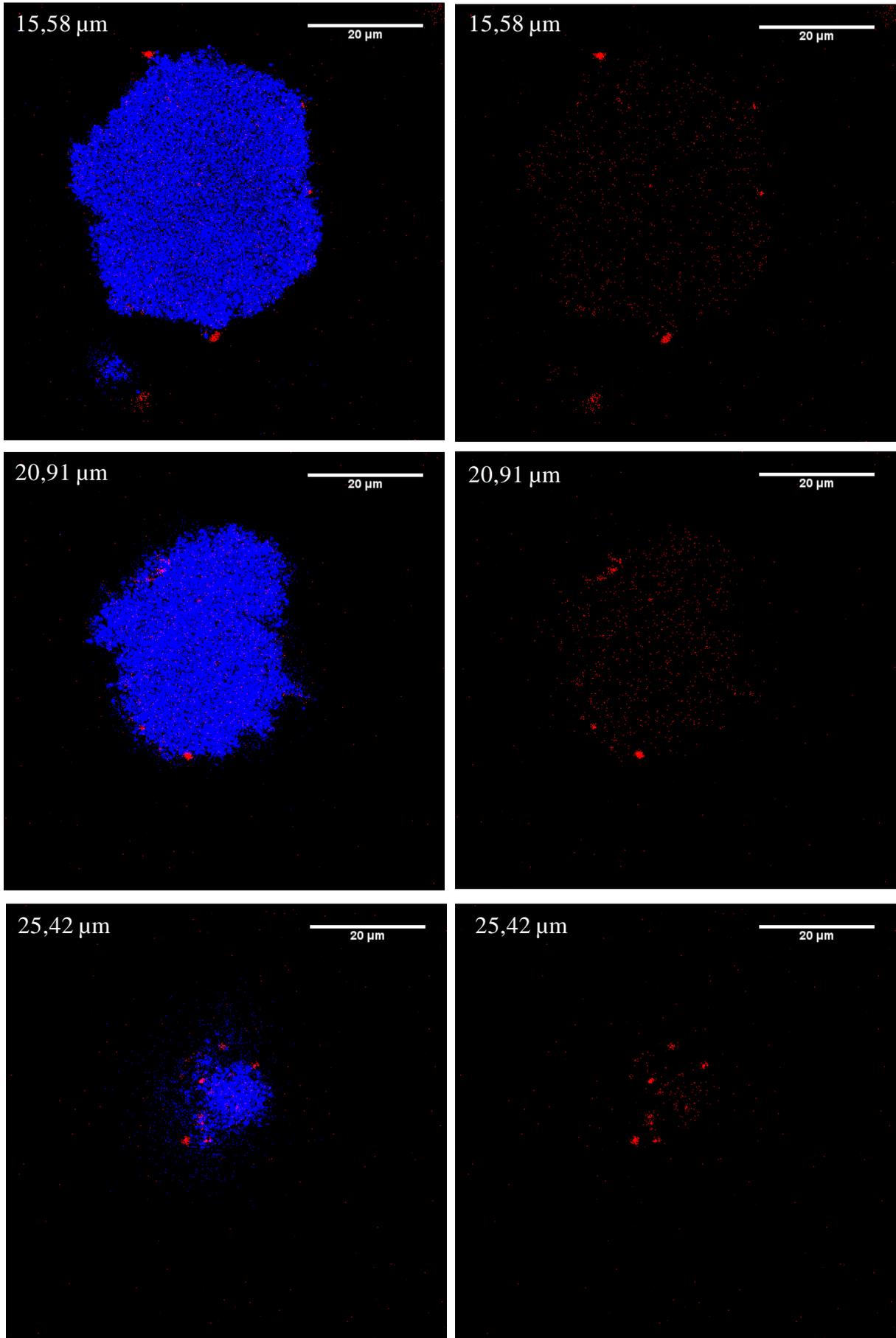




Annexe IV : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-A de 25 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

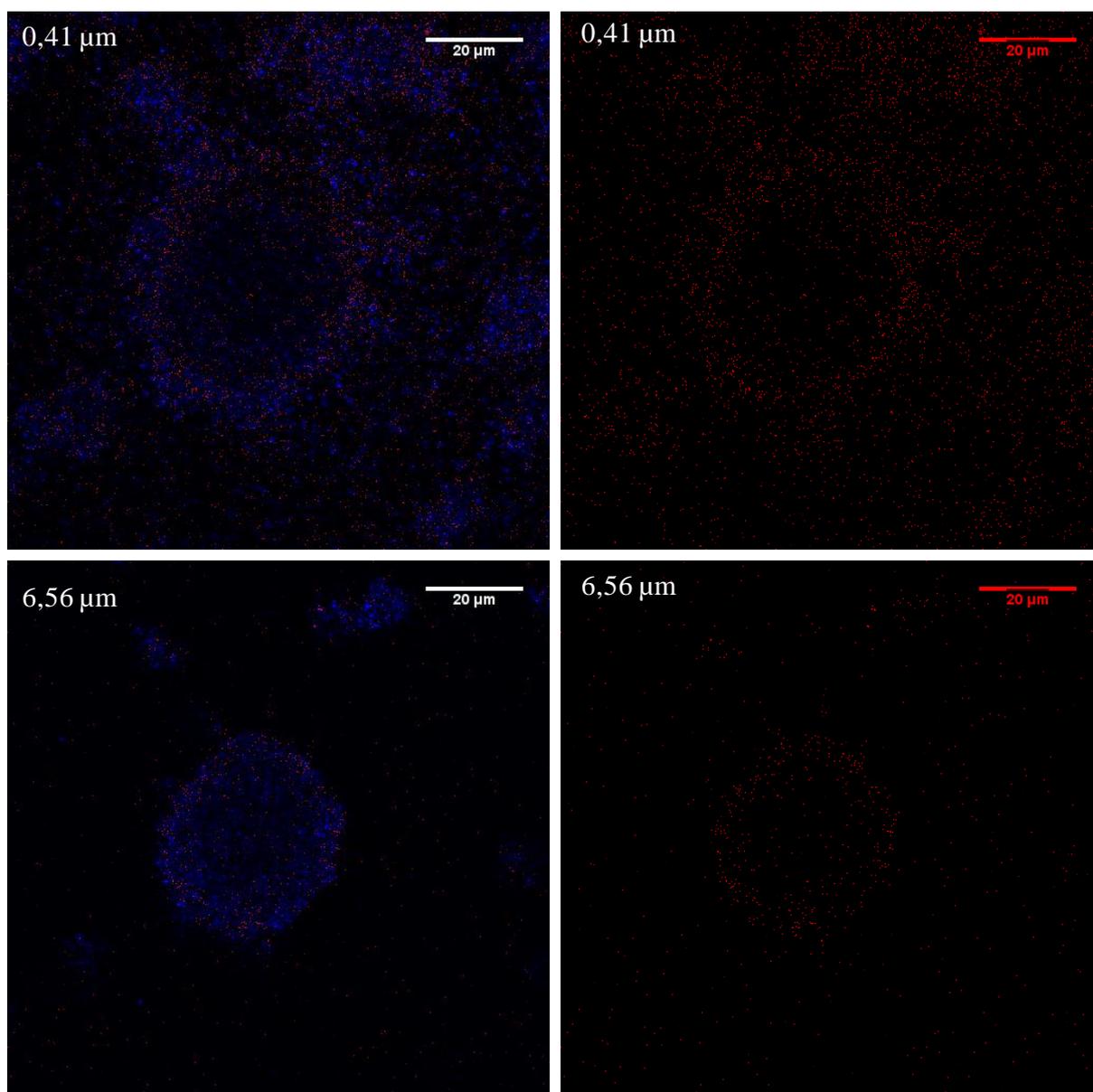
Les clichés de gauche sont la superposition de la fluorescence du SYTO45® (les bactéries) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-A et les clichés de droite sont la luminescence des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-A.

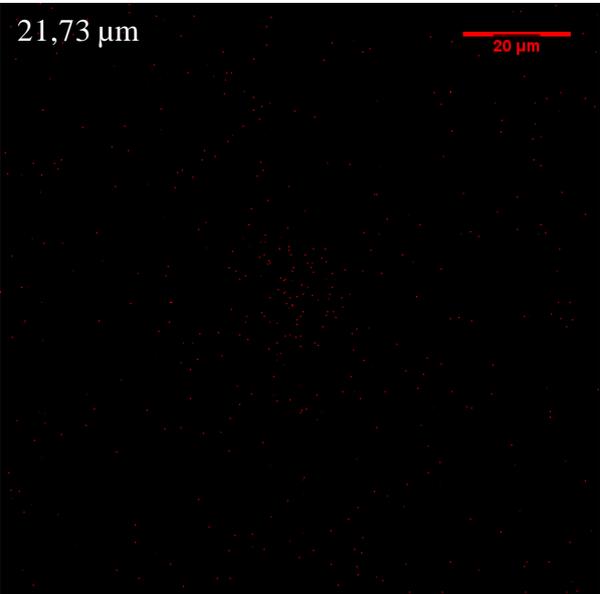
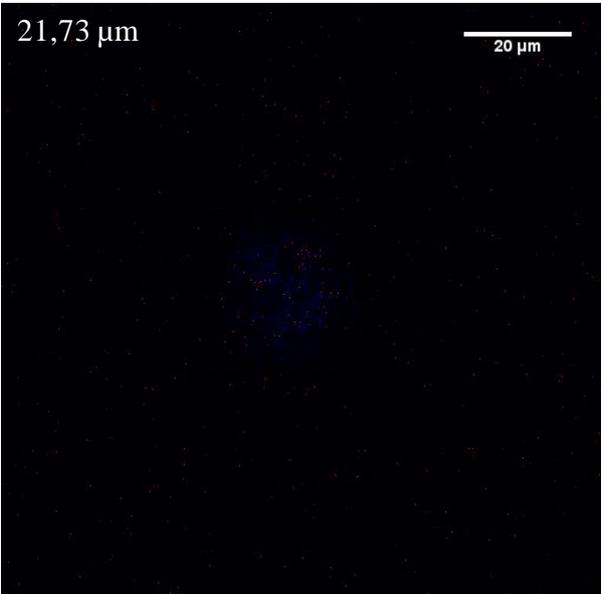
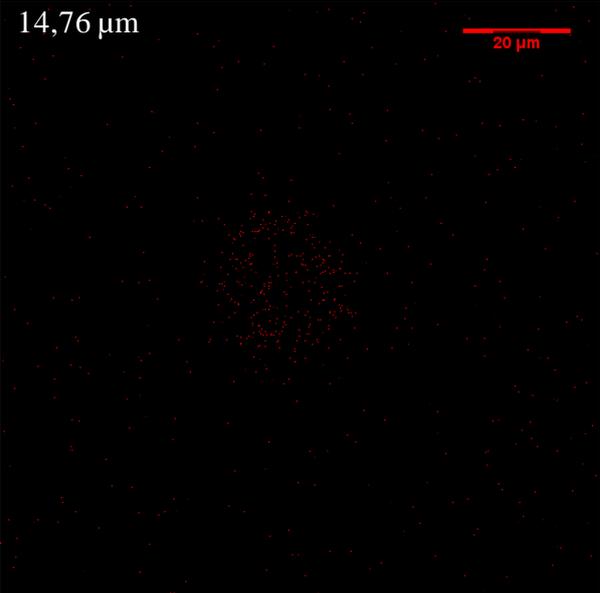
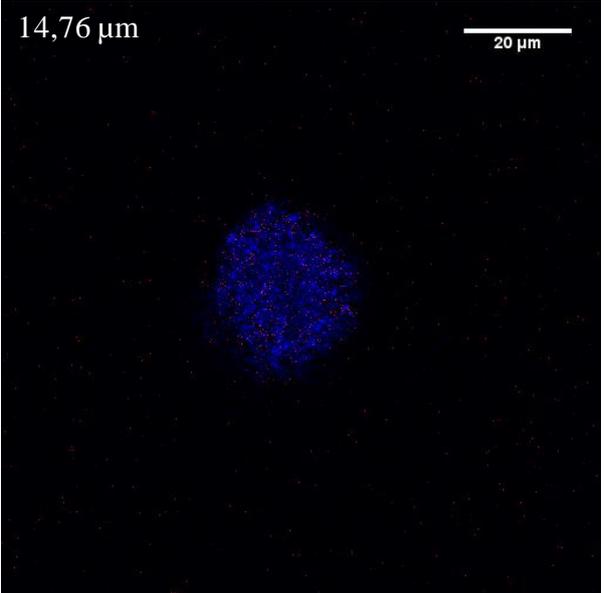




Annexe V: Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-B de 25 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

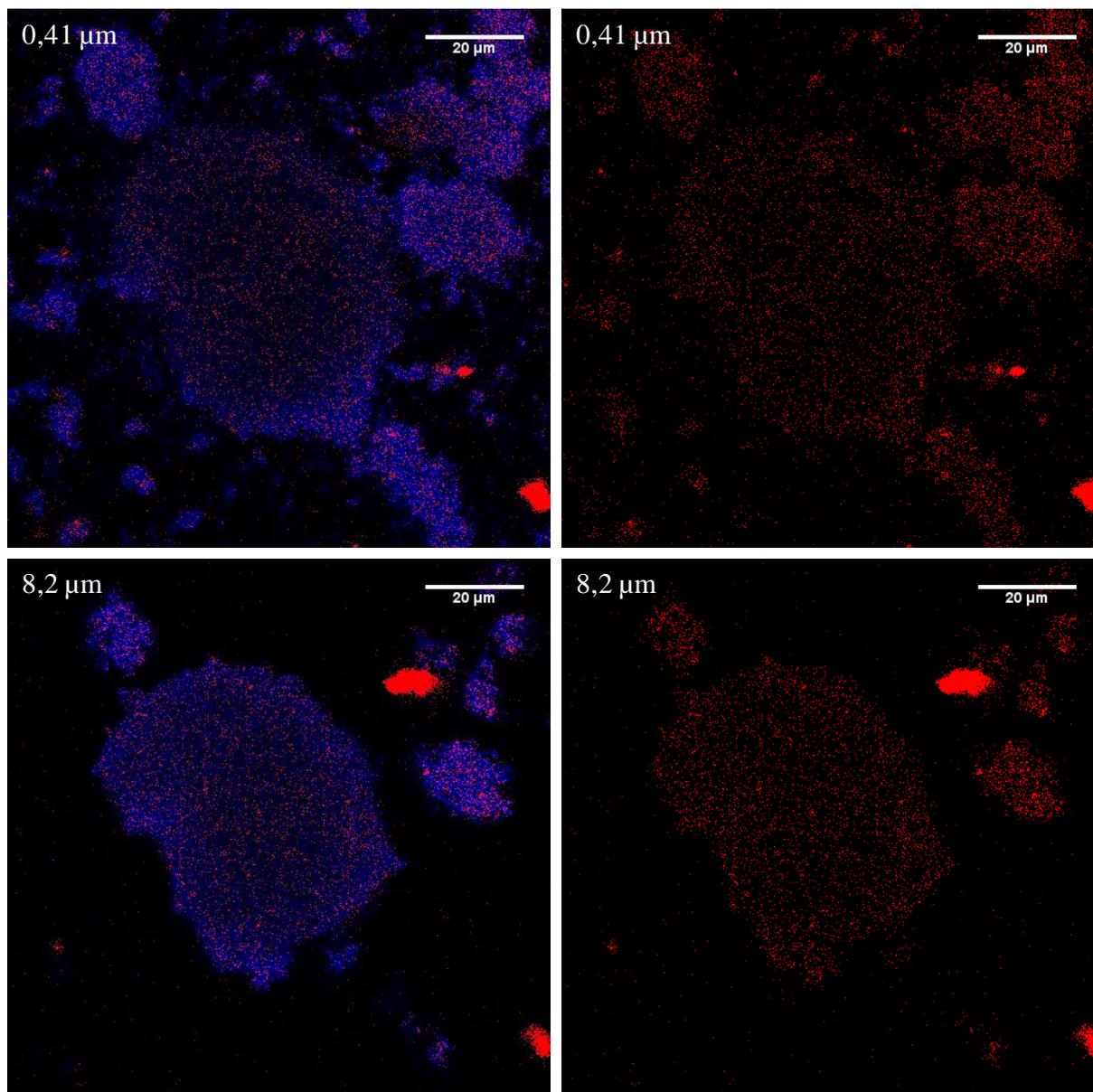
Les clichés de gauche sont la superposition de la fluorescence du SYTO45® (les bactéries) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-B et les clichés de droite sont la luminescence des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-B.

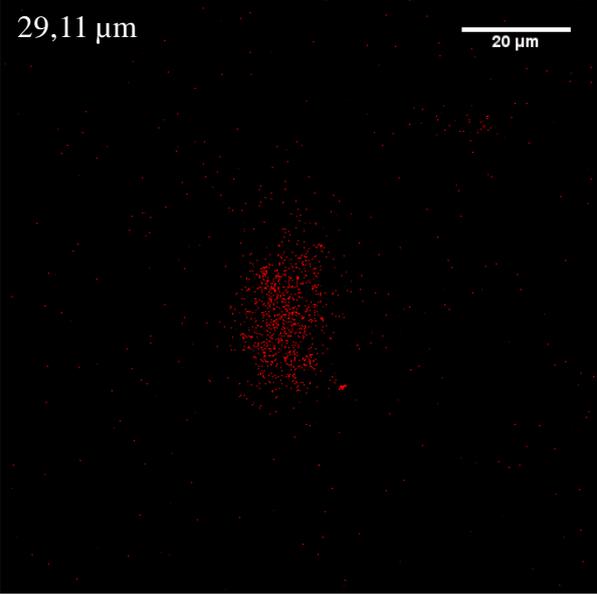
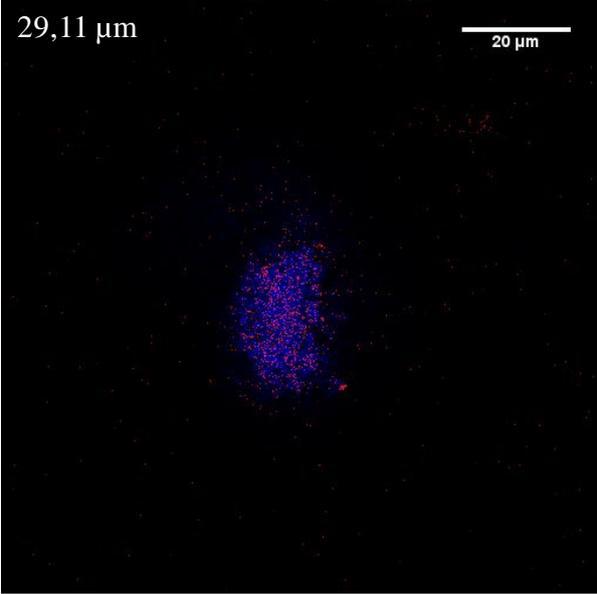
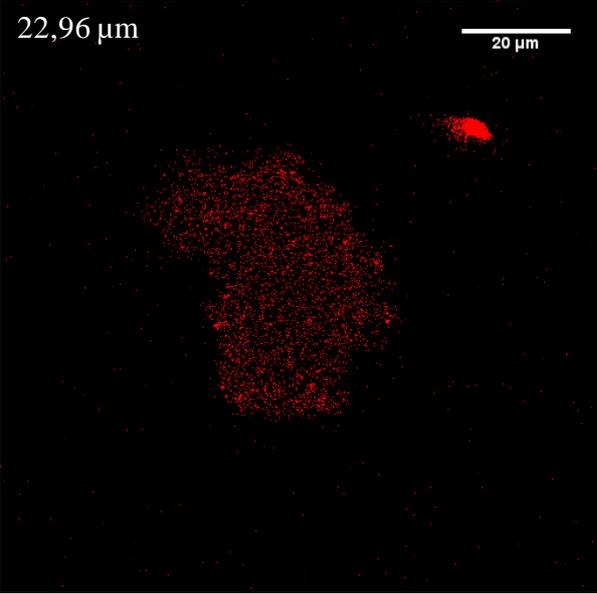
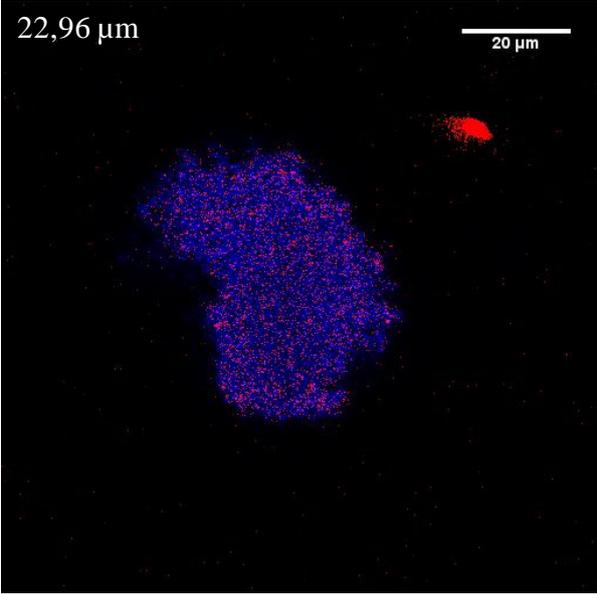
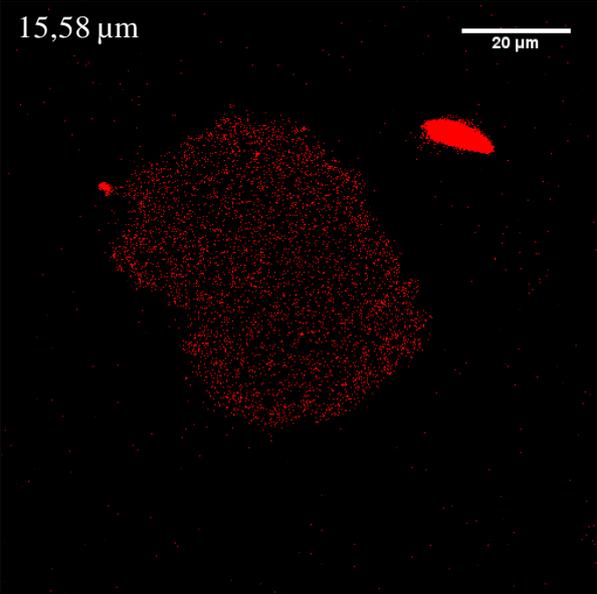
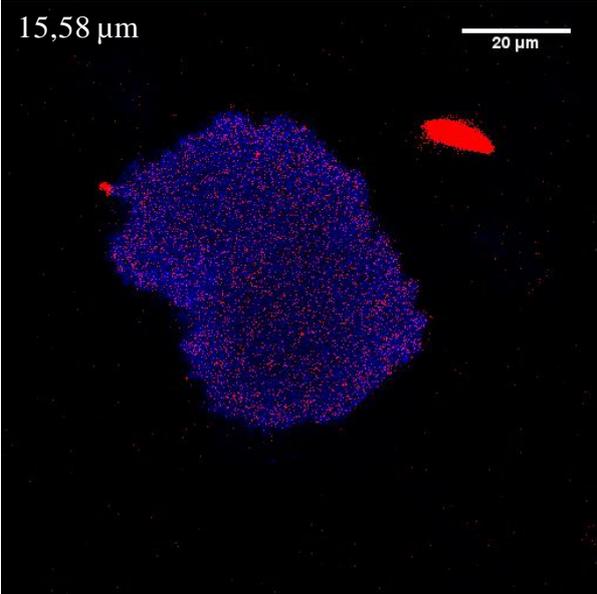




Annexe VI: Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-C de 25 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

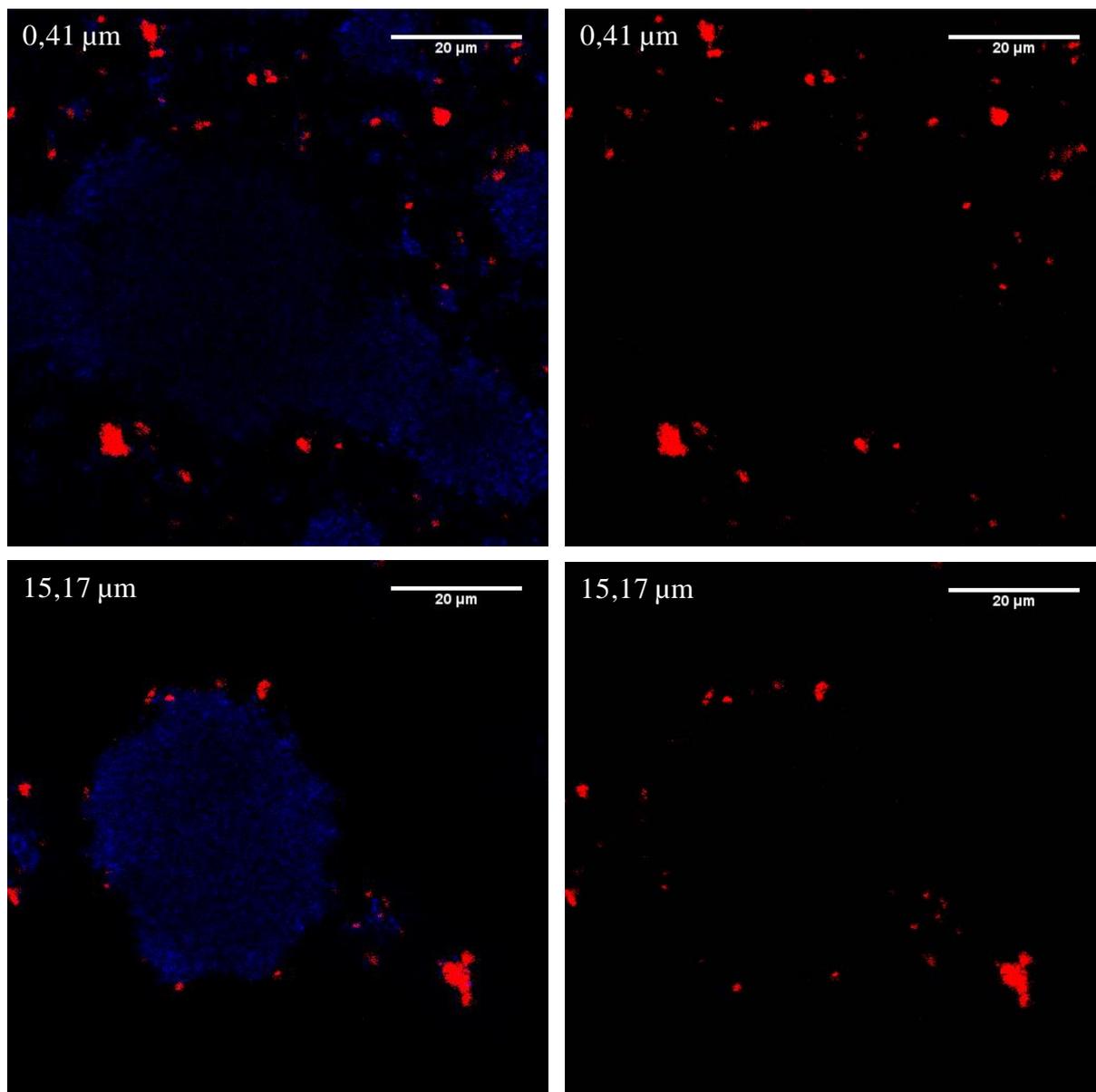
Les clichés de gauche sont la superposition de la fluorescence du SYTO45® (les bactéries) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-C et les clichés de droite sont la luminescence des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-C.

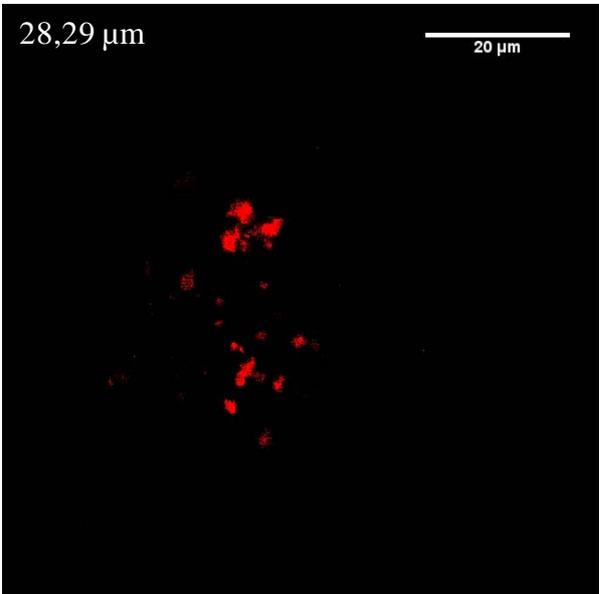
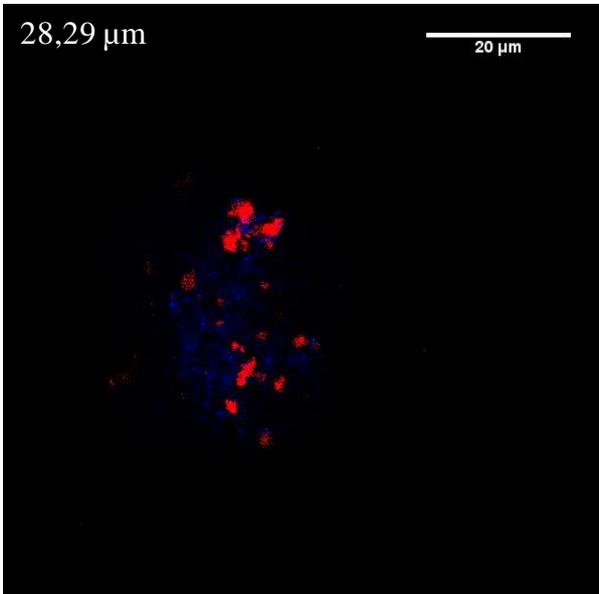
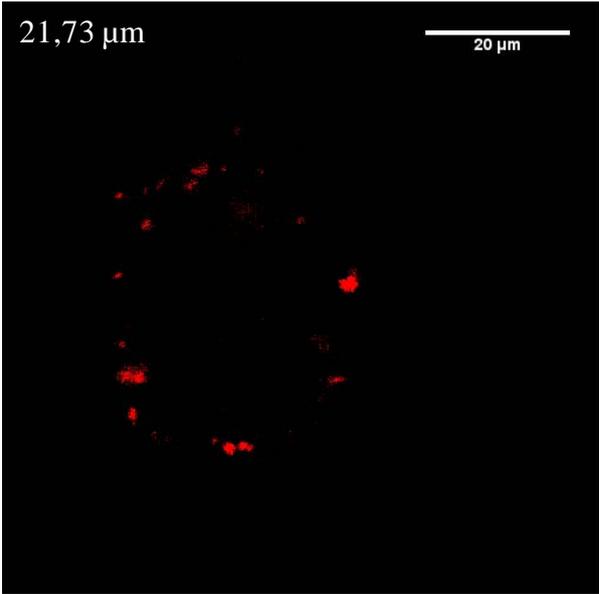
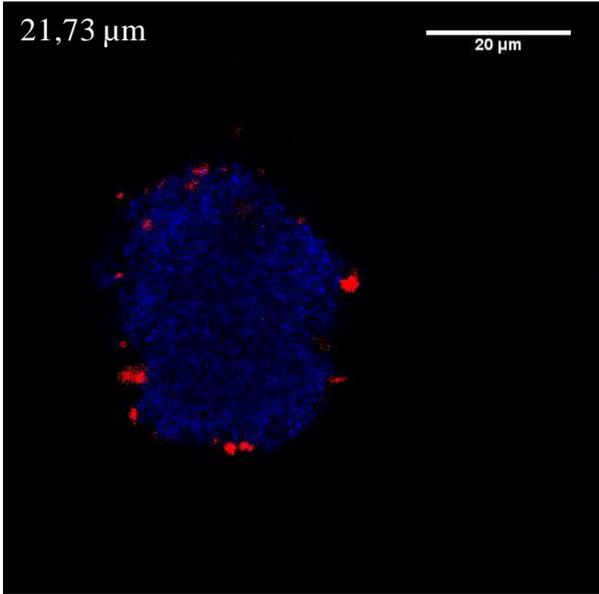




Annexe VII : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-E de 25 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

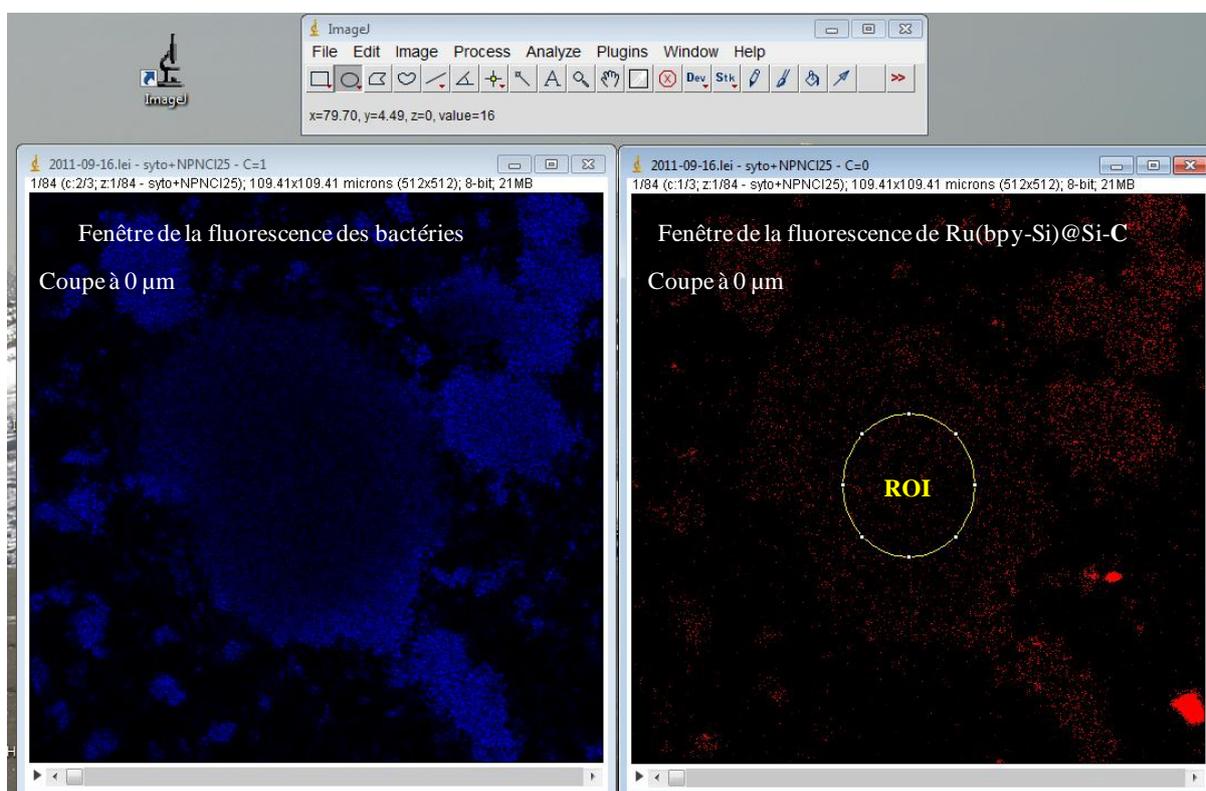
Les clichés de gauche sont la superposition de la fluorescence du SYTO45® (les bactéries) et des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-E et les clichés de droite sont la luminescence des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-E.

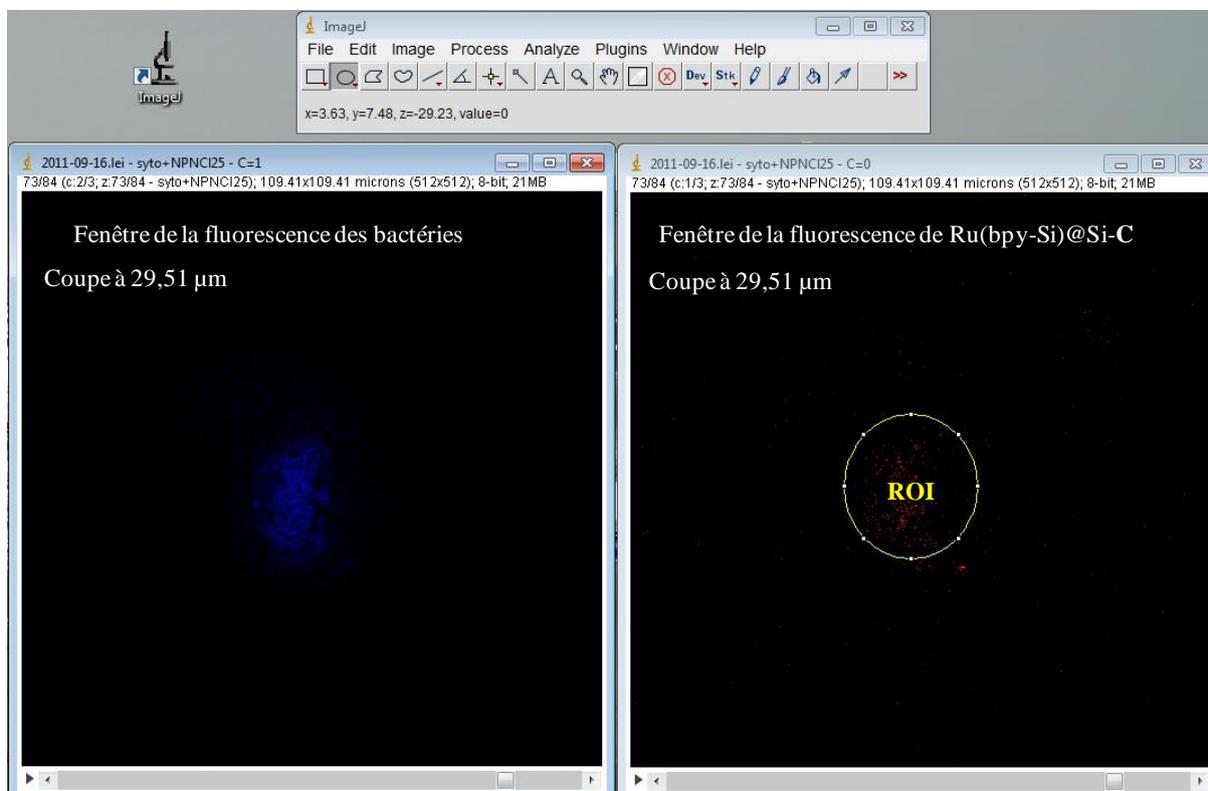
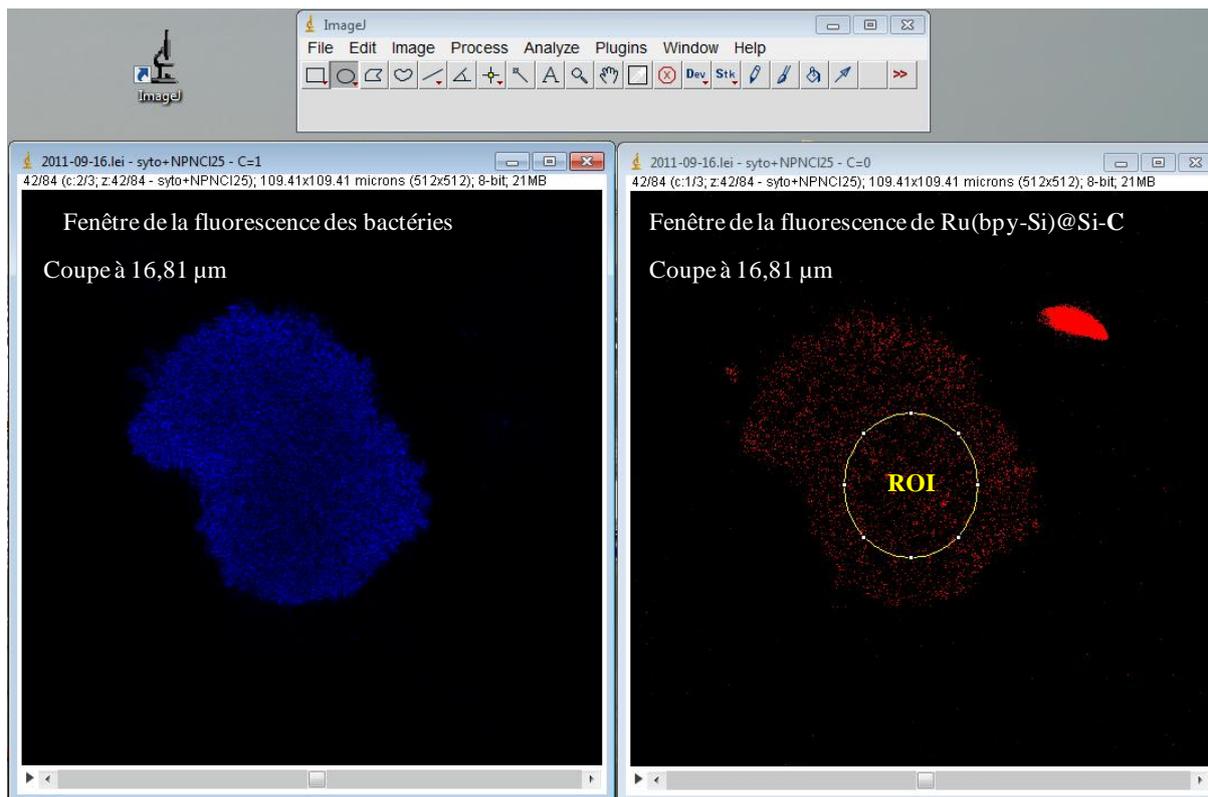




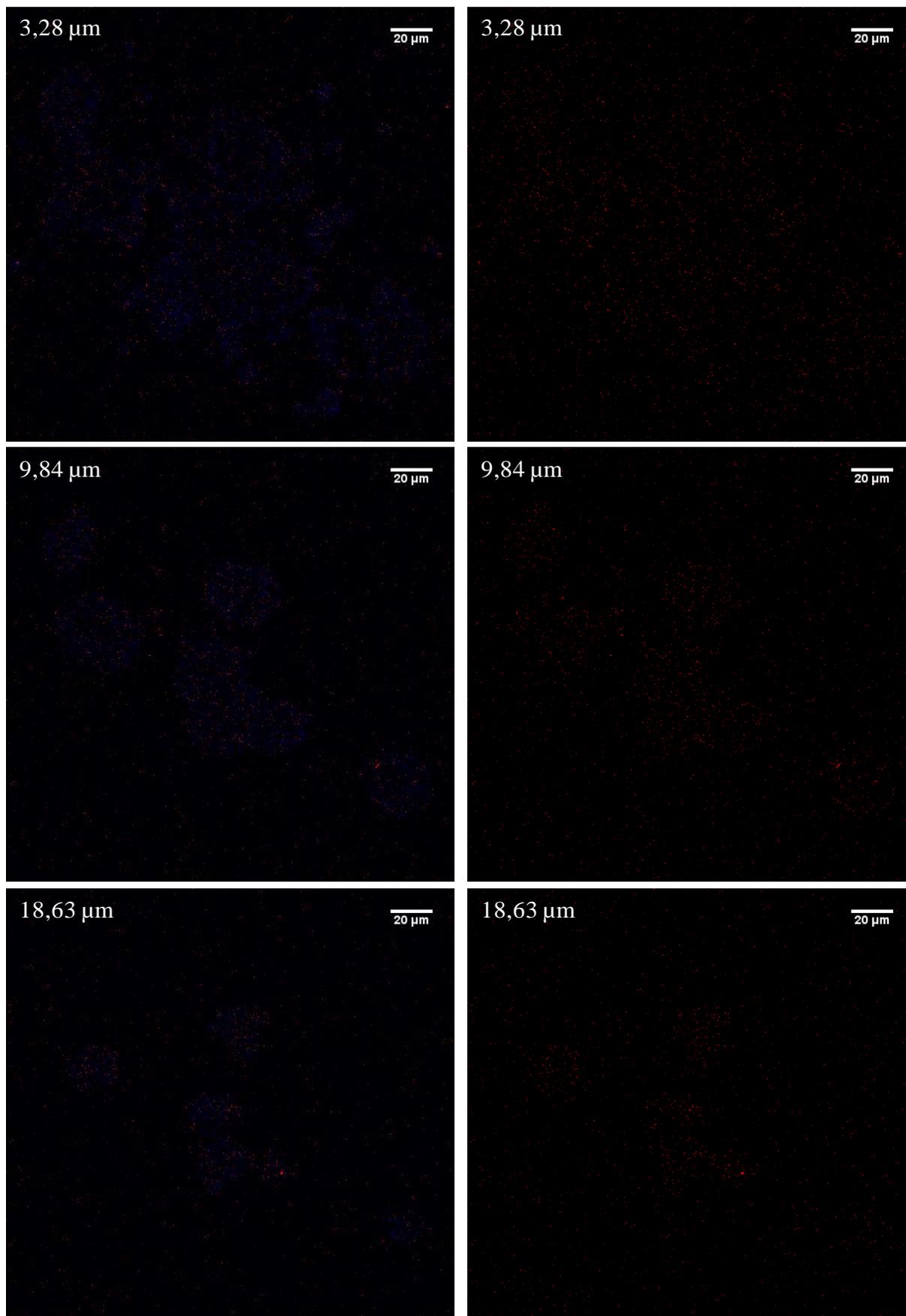
Annexe VIII : Démarche suivie pour l'évaluation de la distribution spatiale des nanoparticules à l'intérieur du biofilm à l'aide d'Image J

Pour connaître la distribution spatiale des nanoparticules à l'intérieur du biofilm, nous avons tracé l'intensité de fluorescence des particules en fonction de l'épaisseur du biofilm. Tout d'abord nous avons sélectionné une région d'intérêt ROI (Region of Interest) à l'intérieur du biofilm. Puis nous avons tracé l'intensité de fluorescence des particules en fonction de l'épaisseur du biofilm avec les commandes suivantes : Image -> Stack -> Plot z-axis profil. Pour comparer l'intensité de fluorescence observée des particules dans les différents échantillons, les ROI ont des surfaces quasi-identiques. Ci-dessous, l'exemple des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-C de 25 nm est donné à différentes épaisseurs dans le biofilm.

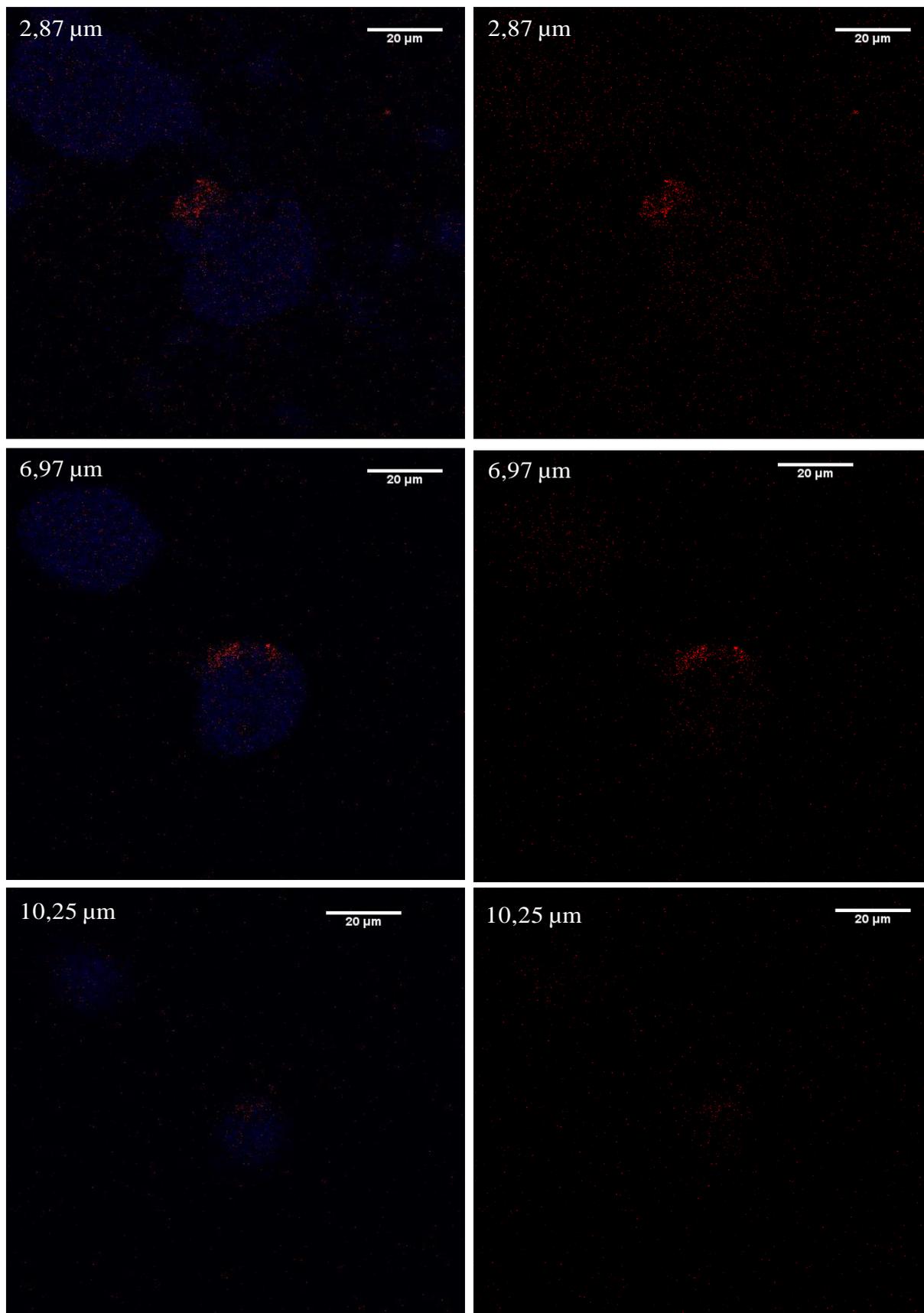




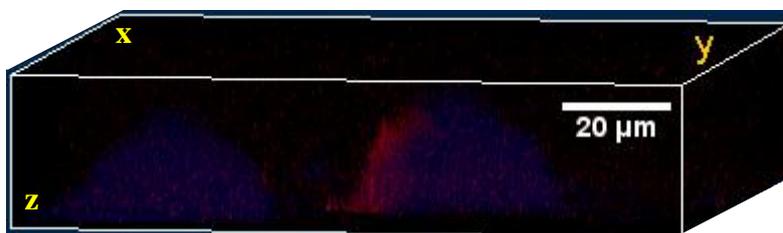
Annexe IX : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si de 68 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm



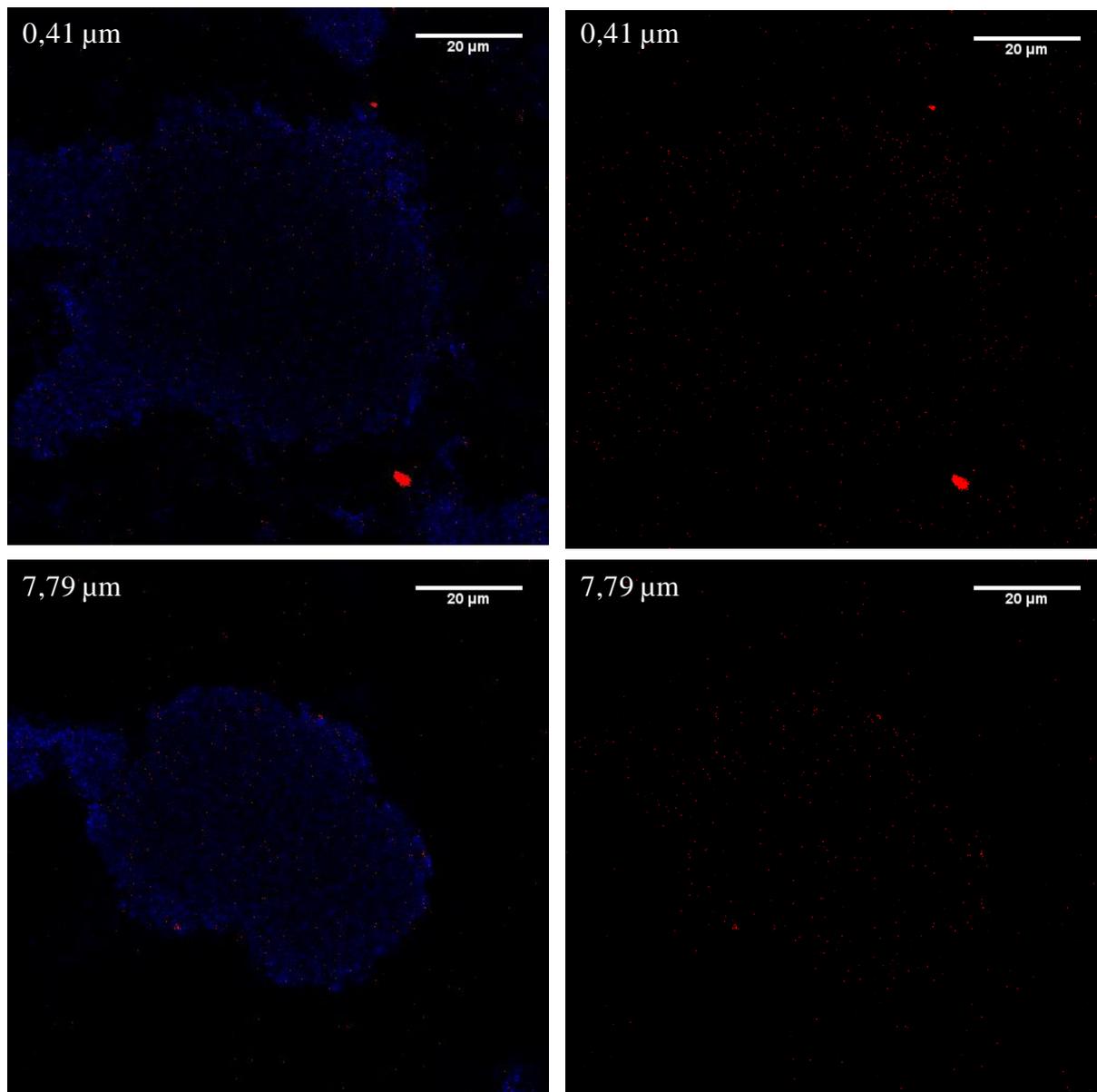
Annexe Xa) : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-A de 68 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm

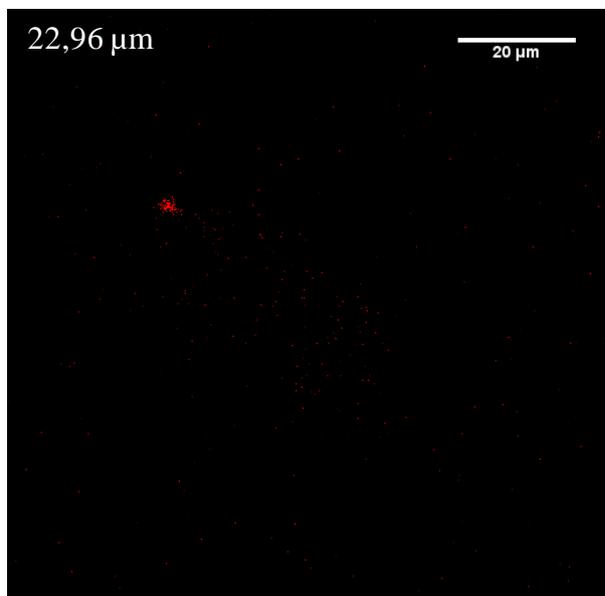
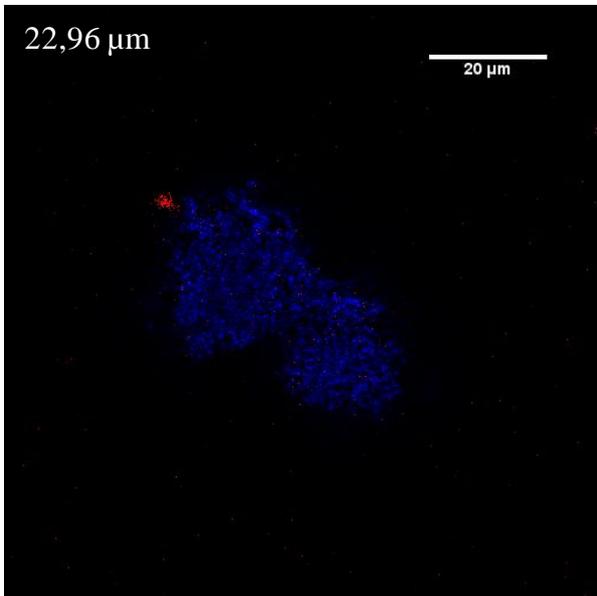
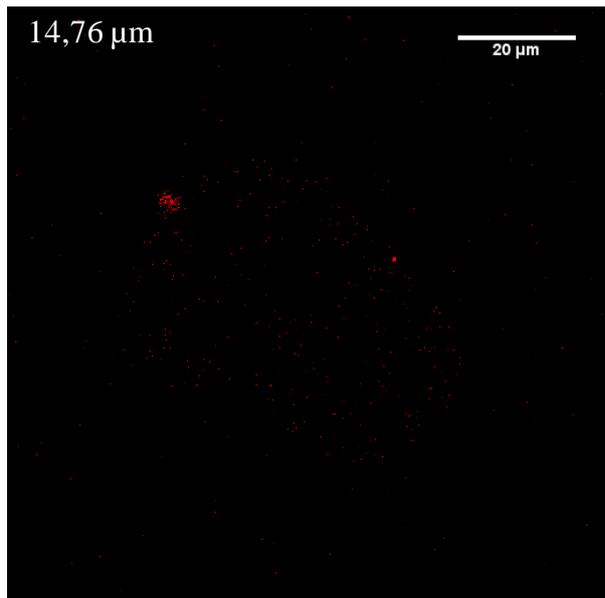
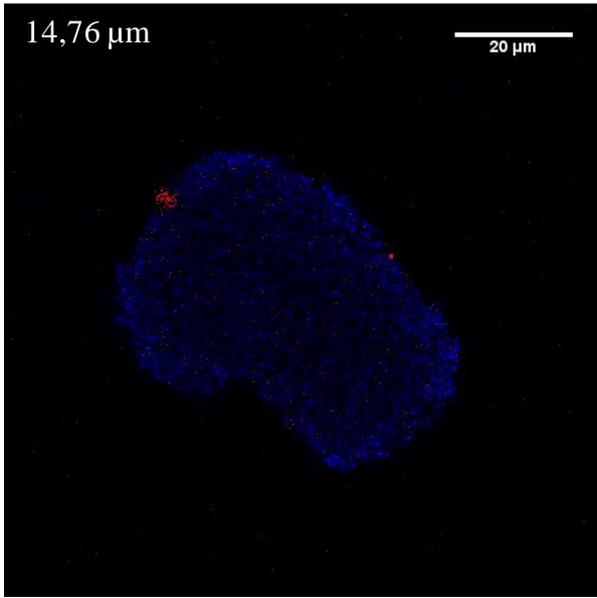


Annexe Xb) : Représentation tridimensionnelle de la distribution spatiale des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-A dans le biofilm

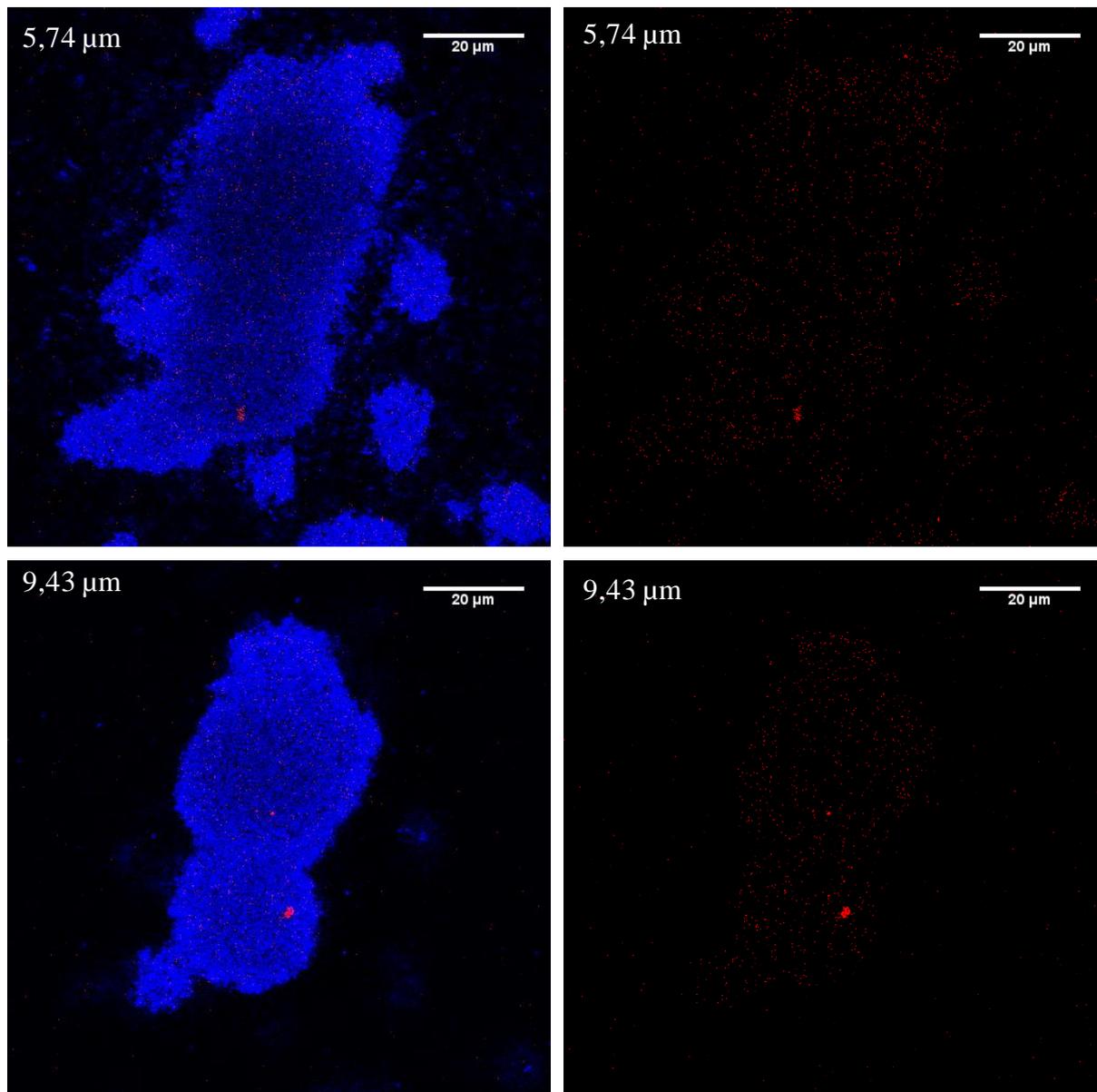


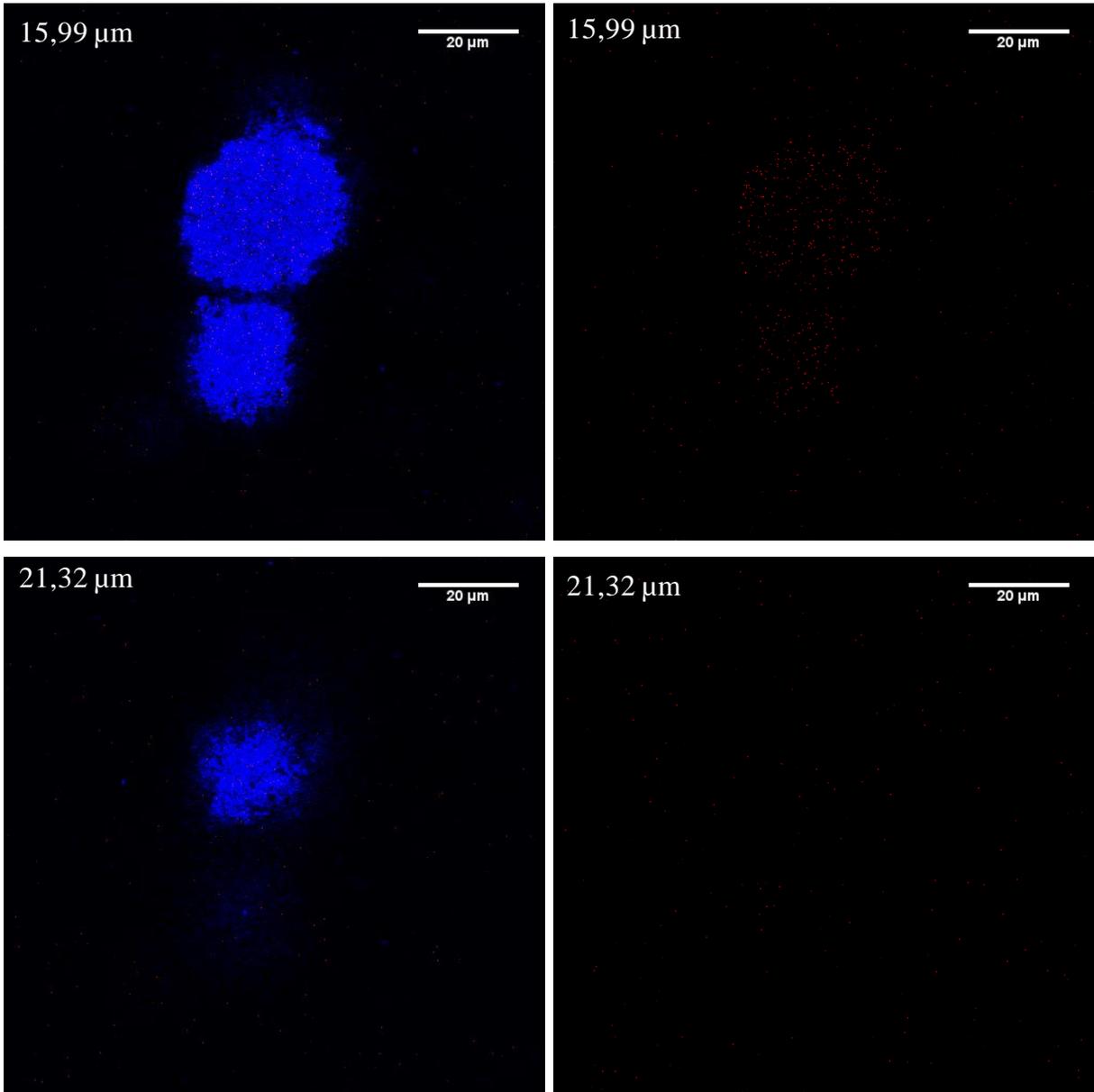
Annexe XI : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-B de 68 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm



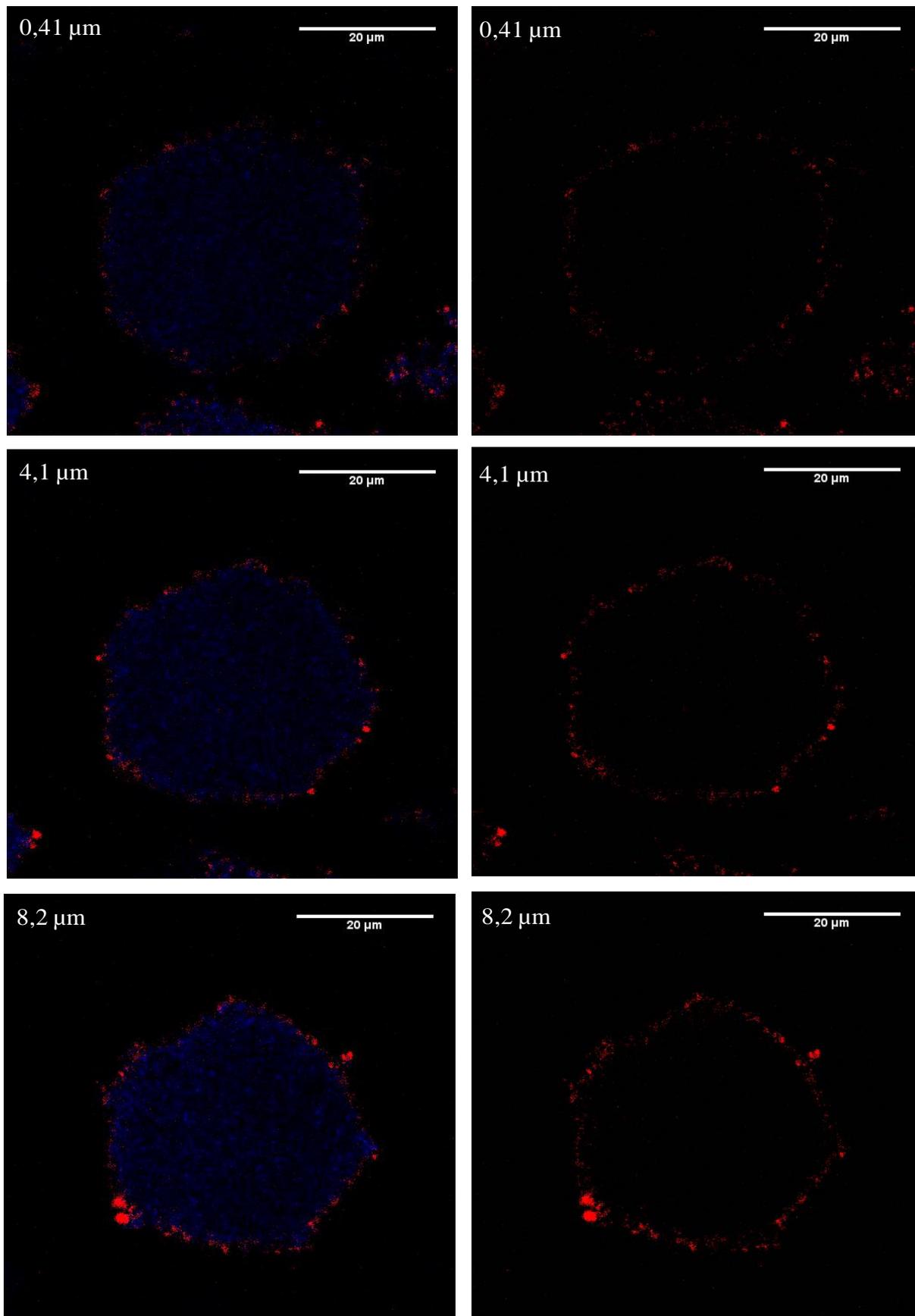


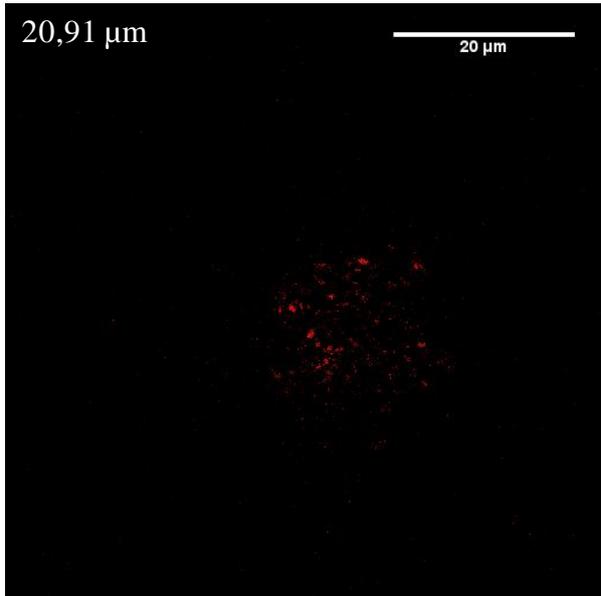
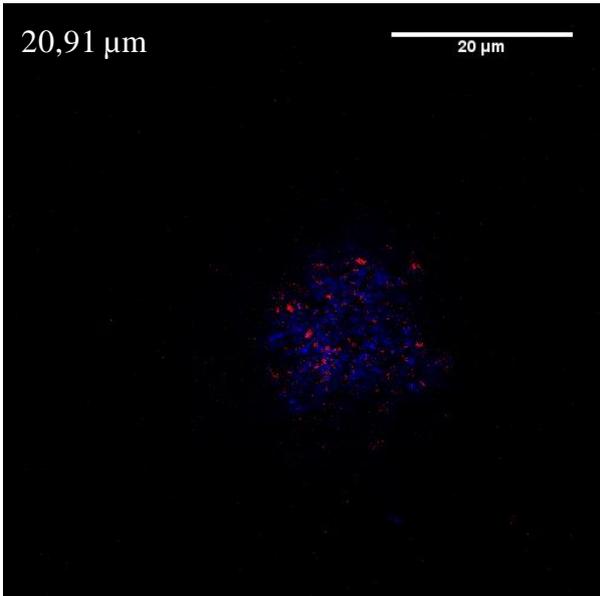
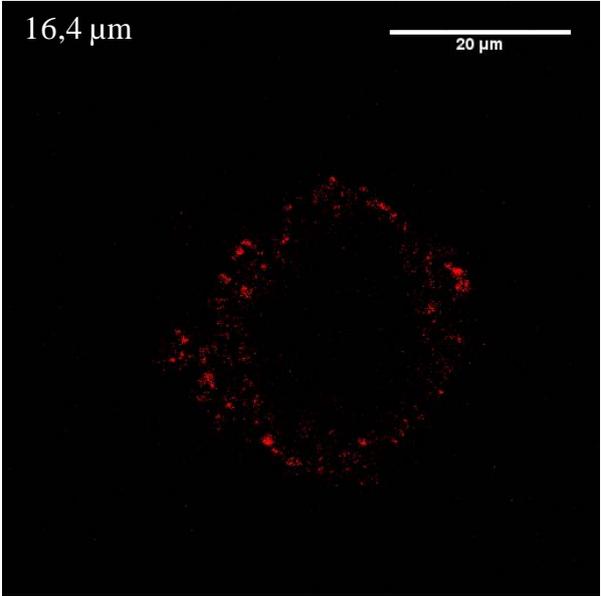
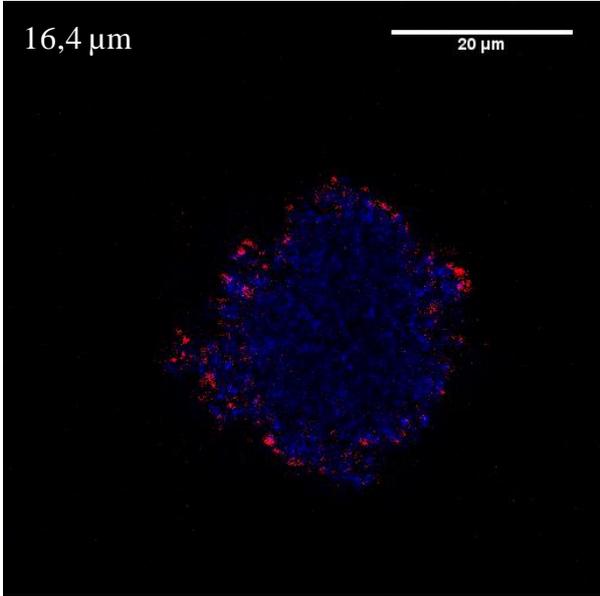
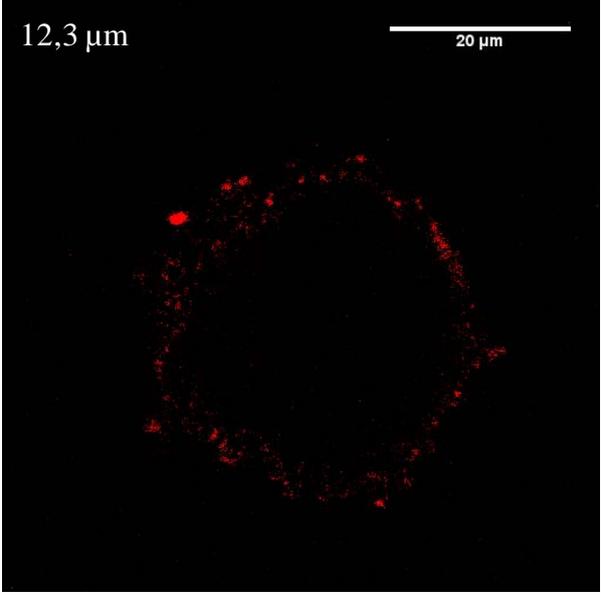
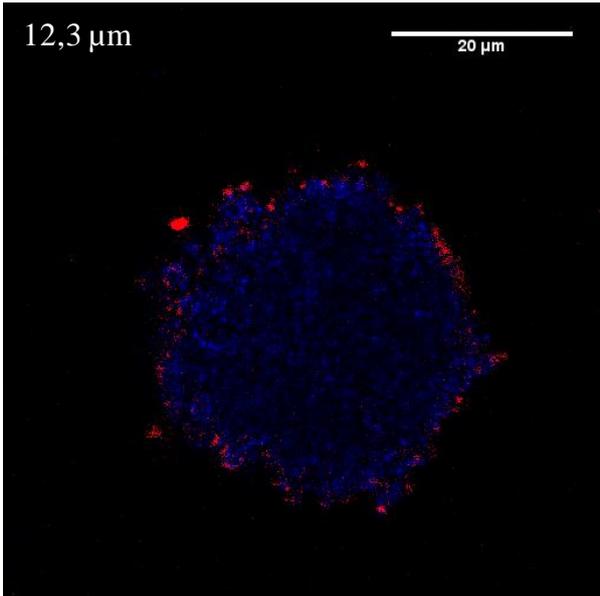
Annexe XII : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-C de 68 nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm



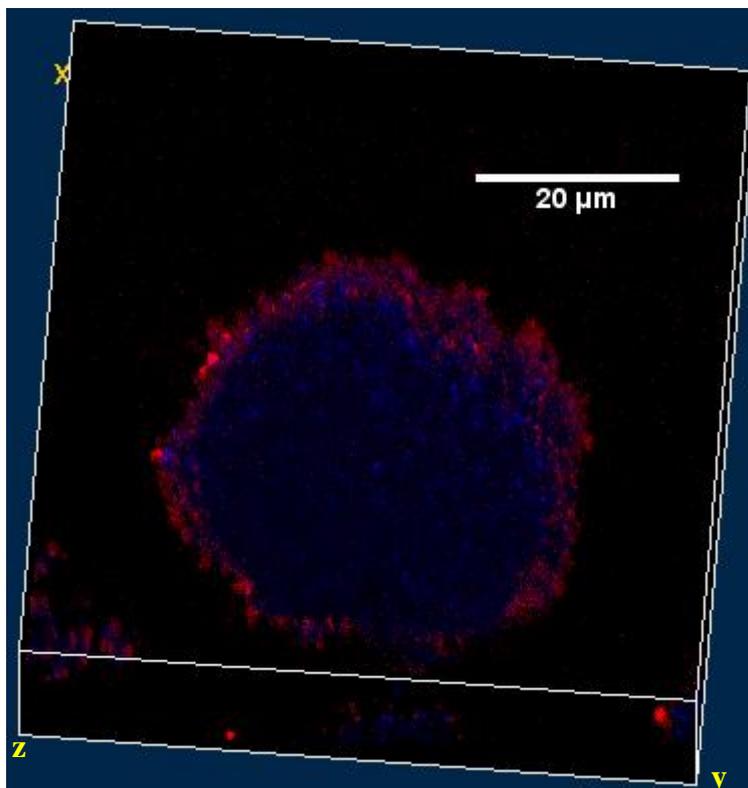


Annexe XIIIa) : Distribution spatiale de Ru(bpy-Si)@Si-E de 68nm – Coupes à différentes épaisseurs dans le biofilm





Annexe XIIIb) : Représentation tridimensionnelle de la distribution spatiale des nanoparticules Ru(bpy-Si)@Si-E de 68 nm dans le biofilm



Résumé

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes emprisonnés dans une matrice auto-produite de substances polymériques extracellulaires (EPS). Elle est souvent impliquée dans la résistance accrue aux traitements chimiques les rendant difficile à éliminer. Fréquemment nuisible en milieu industriel et médical, la problématique des biofilms est un enjeu de santé publique et économique. Il existe peu d'outils permettant d'étudier *in situ* le transport dans les biofilms vivants. Dans cette optique, les nanoparticules de silice luminescentes couplées à la microscopie confocale seraient une voie prometteuse et innovante. L'objectif de notre travail a été d'élaborer des nanoparticules de silice permettant d'explorer les biofilms pour se rendre compte des interactions physico-chimiques avec l'EPS et d'étudier le transport dans les biofilms.

La première partie de ce travail décrit la synthèse et la caractérisation des nanoparticules de silice bifonctionnelles (NPSB) présentant des propriétés de luminescence dues à la présence de complexes de ruthénium(II), des propriétés de surface variées (hydrophile, cationique, anionique ou hydrophobe) et ayant des tailles variées.

La seconde partie de ce travail décrit l'exploration de biofilms à *P. aeruginosa* par ces NPSB. Dans un premier temps la cytotoxicité des particules vis-à-vis des biofilms a été évaluée puis les conditions d'introduction des nanoparticules et leur observation par microscopie confocale ont été mises au point. Lors des observations en microscopie confocale, nous avons montré qu'il y avait un effet de taille sur la pénétration et que la localisation des particules dépend des propriétés de surface des nanoparticules.

Mots-clés : Nanoparticules de silice bifonctionnelles, Complexes Ruthénium(II), Luminescence, Incorporation, Greffage, Biofilms, EPS, Microscopie confocale.

Abstract

Biofilms are micro-organisms community embedded within a self-produced matrix of extracellular polymeric substance (EPS). This matrix is often involved in increased resistance to chemical treatments making them difficult to eradicate. Detrimental in industrial and medical fields, biofilm is a public health and economic issue. Understanding of biofilms requires their exploration but there are few tools to study transport *in situ* in a living biofilms. From this perspective luminescent silica nanoparticles coupled with confocal microscopy would be a promising and innovative route. The aim of this work is to elaborate silica nanoparticles for biofilms exploration in order to understand physicochemical interactions with EPS and to study transport through biofilms.

The first part describes the synthesis and the characterization of bifunctional silica nanoparticles owning luminescent properties (ruthenium complexes) and various surface properties (cationic, anionic, hydrophilic and hydrophobic). These nanomaterials were fully characterized.

The second part presents *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exploration with bifunctional silica nanoparticles. Firstly we evaluated cytotoxicity with respect to biofilms then we tuned introduction conditions of nanoparticles and their observation with confocal microscopy. During confocal microscopy visualization, we demonstrated that functionalized particles were able to penetrate inside biofilms. However size effect on penetration was highlighted, even if size difference isn't important. Particles localization depends on surface properties of nanoparticles.

Key words : Bifunctional silica nanoparticles, Ruthenium(II) complexes, Luminescence, Incorporation, Grafting, Biofilms, EPS, Confocal microscopy