



HAL
open science

Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotés par les bactéries

Samia Dhahri

► **To cite this version:**

Samia Dhahri. Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotés par les bactéries. Géophysique [physics.geo-ph]. Université Montpellier 2, 2013. Français. NNT: . tel-01044714

HAL Id: tel-01044714

<https://theses.hal.science/tel-01044714>

Submitted on 24 Jul 2014

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

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

UNIVERSITE MONTPELLIER II
- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ROUSSILLON-

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Nano-bio-géophysique
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement

Samia DHAHRI

ANALYSE TOPOGRAPHIQUE, MECANIQUE ET ELECTROCHIMIQUE A
L'ECHELLE SUB-MICROMETRIQUE DE PROCESSUS PILOTES PAR LES
BACTERIES.

Utilisation combinée de techniques de microscopie à sonde locale AFM -Microscopie à force
atomique- et SECM -Microscopie électrochimique

Thèse dirigée par Christian MARLIERE

Soutenue le 26/09/2013

Jury :

M. Etienne **Dague**, Chargé de Recherche CNRS, Univ. Toulouse 3-----Rapporteur
M. Grégory **Francius**, Chargé de Recherche CNRS, Univ. Lorraine-----Rapporteur
M^{me}. Touria **Cohen-Bouhacina**, Professeur, Univ Bordeaux 1-----Examineur
M. Jean-Christophe **Gourry**, Ingénieur, BRGM Orléans -----Invité
M. Michel **Ramonda**, Ingénieur de recherche, Univ. Montpellier 2-----Invité
M. Christian **Marlière**, Directeur de Recherche CNRS, Univ. Montpellier 2-----Directeur de thèse
M. Rutger **De Wit**, Directeur de Recherche CNRS, Univ. Montpellier 2 -----Président du jury

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| PREAMBULE | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| SECTION 1 : LES BIOFILMS | 7 |
| 1.1. Définition d'un biofilm | 7 |
| 1.2. Etapes de développement d'un biofilm et interactions bactériennes | 7 |
| 1.2.1. Etapes de développement d'un biofilm | 7 |
| 1.2.2. Adhésion primaire et interactions bactériennes | 9 |
| 1.3. Impact des biofilms et leurs applications | 11 |
| 1.3.1. Impact négatif des biofilms | 11 |
| 1.3.2. Impact positif des biofilms et applications | 12 |
| SECTION 2 : LA BIO REMEDIATION ET SON CONTROLE ELECTRIQUE | 14 |
| 2.1. La bio remédiation et utilisation de biofilms | 14 |
| 2.2. Etude de bactéries dépolluantes | 15 |
| 2.3. Méthodes de contrôle électrique sur site | 18 |
| SECTION 3 : LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM) ET SON APPLICATION AUX OBJETS BIOLOGIQUES | 22 |
| 3.1. La microscopie à force atomique | 22 |
| 3.1.1. Historique | 22 |
| 3.1.2. Principe général | 23 |
| 3.1.3. Les forces d'interactions pointe-surface | 25 |
| 3.1.4. Les modes d'utilisation de l'AFM | 25 |
| 3.1.5. La cartographie de forces | 27 |
| 3.2. Application de l'AFM aux objets biologiques | 29 |
| 3.2.1. Objets biologiques observés par AFM | 30 |
| 3.3. Immobilisation bactérienne pour imagerie AFM en milieu liquide | 34 |
| SECTION 4 : DERIVES DE L'AFM | 37 |
| 4.1. Les différents dérivés des pointes AFM | 38 |
| 4.2. Couplage de l'AFM à la microscopie électrochimique (SECM) | 38 |
| Fabrication des sondes AFM-SECM | 39 |
| 4.2.1. Les sondes AFM-SECM « artisanales » | 39 |
| 4.2.2. Les sondes AFM-SECM « micro-fabriquées » | 39 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 41 |
| MATERIEL ET METHODES | 50 |
| SECTION 1 : IMAGERIE AFM NANOSCOPE III | 52 |
| 1.1. Pointes AFM utilisées | 52 |
| 1.2. Matériel biologique | 53 |
| 1.3. Culture bactérienne | 54 |
| 1.4. Imagerie AFM à l'air | 54 |
| 1.5. Imagerie AFM en milieu liquide | 55 |
| 1.5.1. Difficultés d'imagerie en milieu liquide | 55 |
| 1.5.2. Imagerie AFM en milieu liquide avec immobilisation | 56 |

| | |
|--|-----------|
| SECTION 2 : MISE EN PLACE DU NANOWIZARD 3 | 59 |
| 2.1. Installation Nanowizard 3 et mode QI (Quantitative Imaging) | 59 |
| 2.1.1. Le Nanowizard 3 et ses composantes | 59 |
| 2.1.2. Mode QI (Quantitative Imaging) et conditions d'imagerie | 60 |
| 2.2. Matériel biologique et bactéries utilisées sur Nanowizard 3 | 63 |
| 2.2.1. <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> | 63 |
| 2.2.2. <i>Lacotococcus lactis</i> | 65 |
| 2.2.3. <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Cab) et <i>Desulfovibrio vulgaris Hildenborough</i> (DvH) | 67 |
| SECTION 3 : COUPLAGE AFM SYSTEME OPTIQUE | 68 |
| 3.1. Couplage AFM-suivi optique | 68 |
| 3.2. Traitement des images optiques et AFM | 70 |
| 3.2.1. Traitement des images optiques et AFM pour suivi de déplacement de cyanobactéries | 70 |
| 3.2.2. Traitement des images optiques pour suivi de la croissance bactérienne (DO) | 71 |
| SECTION 4 : MESURES ELECTRIQUES | 72 |
| 4.1. Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam) | 72 |
| 4.1.1. Principe de la sonde ionique focalisée (FIB :Focused Ion Beam) | 73 |
| 4.1.2. Essais réalisation leviers AFM-SECM | 74 |
| 4.2. Mesures AFM en mode électrique avec leviers/électrodes de taille micrométrique : une première approche de l'AFM-EC | 75 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 81 |
| RESULTATS & DISCUSSION | 83 |
| SECTION 1 : IMAGERIE AFM | 84 |
| 1.1. Imagerie AFM en atmosphère gazeuse | 84 |
| 1.2. Imagerie AFM en milieu liquide | 86 |
| 1.3. Imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation | 87 |
| 1.3.1. Essais d'imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation | 87 |
| 1.3.2. Limites et contraintes | 93 |
| SECTION 2 : ETUDE AFM EN MILIEU LIQUIDE DE BACTERIES SANS IMMOBILISATION | 94 |
| 2.1. Imagerie AFM en milieu liquide sans immobilisation | 94 |
| 2.1.1. Cyanobactéries | 94 |
| 2.1.2. <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> | 96 |
| 2.1.3. <i>Lacotococcus lactis</i> | 100 |
| 2.1.4. <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Cab) et <i>Desulfovibrio vulgaris Hildenborough</i> (DvH) | 102 |
| 2.1.4.2. <i>Desulfovibrio vulgaris Hildenborough</i> (DvH) | 103 |
| 2.1.4.3. Coculture Cab-DvH | 104 |
| 2.2. Etude topographique et mécanique par AFM sur les cyanobactéries | 105 |
| 2.2.1. Présentation de l'étude | 105 |
| 2.2.2. Publication « «In-situ determination of the mechanical properties of gliding or non-motile bacteria by Atomic Force Microscopy under physiological conditions without immobilization» | 108 |
| SECTION 3 : MESURES AFM COMBINEES A DES MESURES ELECTROCHIMIQUES | 131 |
| 1.1. Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam) | 131 |

| | |
|--|------------|
| 1.1.1. Essais à l'INL de Lyon | 131 |
| 1.1.2. Essais à l'IMPMC Paris | 133 |
| 1.2. Mesures électriques et électro-chimiques en mode approche-retrait (QI de JPK) | 135 |
| 1.2.1. Expériences électriques en mode I(V) en différents endroits quasi-ponctuels | 136 |
| 1.2.2. Expériences électriques en imagerie QI à potentiel électrique constant | 149 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 153 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 155 |
| ANNEXES | 158 |
| ANNEXE 1 | 159 |
| ANNEXE 2 | 162 |
| ANNEXE 3 | 167 |
| REMERCIEMENTS | 176 |
| RESUME | 182 |
| ABSTRACT | 183 |

Préambule

Les sols ne constituent pas une masse purement minérale, ils contiennent aussi de la matière organique avec une flore microscopique riche et active (de 10^5 à 10^6 microorganismes/gramme). Cette biomasse, longtemps négligée, est pourtant une composante essentielle du sol, au même titre que ses caractéristiques physicochimiques. Aujourd'hui, sa présence dans des sites superficiels ou profonds de stockage géologique est avérée avec une activité physicochimique considérable qui lui est associée. Elle se traduit, par exemple, par des réactions de dissolution et de précipitation des roches constituant un site, engendrant des processus de colmatage, fermeture/ouverture de chemins d'écoulement ; ou encore par des interactions avec de nombreux composés, en solution ou en phase solide, produisant divers métabolites et biomolécules, qui modifient la réactivité, la solubilité, la chimie redox de composés stockés dans des sites de confinement avec des répercussions importantes sur la durabilité et la pérennité des stockages.

Pour l'étude de ces problématiques, la démarche actuelle utilisée en géophysique est principalement macroscopique. Les méthodes chimiques et physiques, utilisées pour l'obtention des informations concernant les différents processus bactériens de type oxydo-réductif, ne permettent l'accès qu'à des valeurs moyennées sur des volumes importants par rapport à ceux typiques des bactéries. Aussi, l'essentiel des connaissances sur cette activité bactérienne repose sur des études réalisées dans des conditions où les bactéries ont un mode de vie essentiellement planctonique alors qu'en réalité elles se développent aussi aux surfaces, enrobées d'une matrice, sous forme de biofilms.

Ces biofilms, souvent décrits comme source de problèmes sanitaires, industriels et écologiques, présentent aussi des propriétés très intéressantes qui peuvent être utilisées de façon avantageuse. On peut citer, dans ce cadre, l'exemple des « piles à combustible microbiennes » assurant la conversion par des réactions redox de matières organiques en énergie électrique, pilotés par la matière bactérienne. Un autre exemple, la biodépollution, reposant sur l'activation de la biodégradation bactérienne. En effet, il existe des bactéries qui se développent dans le sol pollué et qui se nourrissent notamment du polluant présent. Leur métabolisme étant souvent limité par des facteurs environnementaux, le principe de la biodépollution est d'optimiser ces facteurs (oxygène, humidité, température et éléments nutritifs) afin d'augmenter la densité et l'activité des populations bactériennes.

Les biodépollutions sont actuellement menées, en grande partie en aveugle, excepté sur les quelques forages ponctuels de contrôle du site. Le présent projet de thèse s'inscrit dans le cadre global d'un projet ANR BIOPHY portant le titre d' « Optimisation de procédés de BIODépollution des eaux souterraines contaminées par des hydrocarbures par un monitoring géoPHYsique et analyse de gaz en ligne ». Ce projet vise à élaborer un ensemble d'outils de surveillance de l'activité de biodégradation afin de gagner en confiance sur les performances du traitement et par conséquent amener un gain sur le coût et la durée de la décontamination. Les travaux de ce projet sont menés à trois échelles 1. Surveillance géophysique et analyse de CO₂ pendant le biotraitement afin d'en démontrer la faisabilité à l'échelle du terrain, 2. Etude des propriétés électriques et analyse du CO₂ à l'échelle d'une colonne, afin de comprendre l'influence de paramètres extérieurs (milieu solide, oxygénation, métabolites, bactéries) sur les signaux mesurés, 3. Etude des propriétés électriques des bactéries à l'échelle microscopique, afin de comprendre l'origine des phénomènes observés aux grandes échelles. C'est dans le cadre de ce troisième axe que se situe le présent travail. En effet, et comme mentionné plus haut, la démarche macroscopique à elle seule ne peut apporter les réponses recherchées et seules des études en laboratoire, permettant d'accéder aux dimensions caractéristiques des cellules bactériennes, peuvent apporter des informations véritablement pertinentes.

A cette fin, nous nous intéressons aux premières étapes de formation d'un biofilm, à savoir l'adhésion initiale des microorganismes à la surface qui fait intervenir un ensemble de processus bactériens très spécifiques qui peuvent être associés à des processus de communications intercellulaires. Notre démarche scientifique consiste à étudier les phénomènes à l'échelle où ils se produisent (sub-micrométrique) pour mieux comprendre ce qui est observé à plus grande échelle. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique expérimentale innovante, aux performances adaptées à nos objectifs mais encore insuffisamment utilisée, car de mise en œuvre délicate, à savoir la combinaison de la microscopie à force atomique (AFM) aux microscopies électrochimique (SECM) et optique, afin d'obtenir, indépendamment, des informations sur la topographie de l'échantillon et sur les processus électrochimiques à l'échelle des bactéries. L'étude est conduite à une échelle sub-micrométrique par AFM en milieu liquide, sur un nouveau banc expérimental que j'ai contribué à mettre en place et valider : celui-ci permet de réaliser des mesures topographiques (AFM) combiné à un suivi optique in situ du développement bactérien au cours du temps. Ce système a été associé, tout récemment, à des mesures électriques et électrochimiques au

moyen de sondes de taille micrométrique, la pointe et le levier AFM, en attendant de tester notre système avec des sondes de taille « électrique » nanométrique qui ouvriront la voie vers des mesures encore plus locales.

Concernant le déroulement de la thèse, il est important d'en souligner les étapes clés, afin d'avoir une meilleure compréhension de l'ensemble du travail qui sera présenté.

J'ai débuté ma thèse en Octobre 2010. L'enjeu était alors d'importance, puisqu'il s'agissait de lancer une nouvelle thématique de recherche au laboratoire dans un domaine nouveau situé à l'interface entre la géophysique, la physique, la chimie et la biologie. Tout était donc à faire, depuis la maîtrise d'une technique exigeante, la microscopie à force atomique -AFM- et ses dérivés, jusqu'à l'installation, la qualification d'un nouveau banc expérimental combinant l'AFM à des mesures optiques, électriques ou électrochimiques de précision et l'obtention des premiers résultats. La tâche était ardue, puisque l'équipe mobilisée sur ce projet se réduisait à mon directeur de thèse, Christian Marlière, et à moi-même, d'autant plus qu'étant biologiste de formation (ingénieur en biologie industrielle à l'INSA de Tunis, puis master à l'INPL de Nancy où mes sujets de recherche concernaient essentiellement la biologie par exemple en master 2 « Etude de l'ancrage de la protéase de paroi PrtS chez la bactérie *Streptococcus thermophilus* »), j'avais beaucoup de connaissances à acquérir dans les autres domaines intervenant dans ce projet.

Il fallait donc se lancer avec le matériel disponible, et les premières expérimentations ont alors été menées d'une part, au laboratoire d'Ecologie des Systèmes Marins côtiers -Ecosym- avec la collaboration de Mr De Wit Rutger pour les cultures bactériennes (d'abord sur des bactéries modèles les « cyanobactéries », avant de passer aux bactéries d'intérêt pour la biodépollution « *Streptococcus wratislaviensis* ») ; et d'autre part, à la centrale de technologie en micro et nanoélectronique -CTM- avec la collaboration de Mr Michel Ramonda pour l'apprentissage de l'AFM, les premières expérimentations de l'imagerie AFM de bactéries et les premiers résultats. Cette première partie du travail a été menée avec beaucoup de détermination dans l'appropriation de cette thématique pluridisciplinaire et la mise en place des différents éléments expérimentaux,

Dans un deuxième temps, à la fin de l'année 2010, un projet ANR soumis avec d'autres partenaires (BRGM, TOTAL, LPC2E et SERPOL) a été accepté, et les fonds ont été attribués début 2011. Un appel d'offre a été alors lancé pour acquérir du matériel plus adapté aux expériences projetées. Le choix s'est finalement fait sur le microscope à force atomique

« Nanowizard 3 » de JPK combiné au microscope optique inversé Zeiss. L'ensemble de ce matériel a été mis en place dans une salle mise à notre disposition à Géosciences Montpellier et que nous avons aménagée en octobre 2011 afin d'y placer le matériel expérimental (principalement le banc de microscopies mais aussi d'autres appareillages comme le potentiostat, étuves et matériel de routine de microbiologie). Une phase d'installation, de prise en main et de vérifications des performances de ce nouveau microscope a été nécessaire. Un grand travail a aussi été fourni pour la mise en place des programmes nécessaires au traitement des données. Et à partir de ce moment, nous avons à notre entière disposition le matériel nécessaire pour mener nos recherches dans des conditions convenables, et nous avons commencé à explorer la possibilité d'imager par AFM des bactéries en liquide sans étape d'immobilisation préalable, avec des premiers succès liés à une étude complète de la reptation de cyanobactéries par AFM en milieu liquide et physiologique, qui a donné lieu à une publication parue en Avril 2013.

L'ensemble des travaux menés tout au long de ces trois années seront présentés comme suit : dans la première partie du manuscrit, une étude bibliographique concernant les biofilms, leur utilisation dans la biodépollution, ainsi que les techniques de microscopie à force atomique et la microscopie électrochimique permettant de les étudier seront développés. Dans la deuxième partie, le protocole expérimental et méthodes développés dans le cadre de nos travaux seront présentés. Enfin, un chapitre sera consacré aux résultats topographiques obtenus grâce au banc expérimental développé, les résultats obtenus sur les mesures électriques et électrochimiques seront synthétisés, les difficultés rencontrées au cours de ces études mentionnées et les perspectives envisagées à la suite de ce travail seront exposées.

Contenu

| | |
|---|----------|
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 6 |
| SECTION 1 : LES BIOFILMS | 7 |
| 1.1. <i>Définition d'un biofilm</i> | 7 |
| 1.2. <i>Etapes de développement d'un biofilm et interactions bactériennes.....</i> | 7 |
| 1.2.1. Etapes de développement d'un biofilm | 7 |
| 1.2.2. Adhésion primaire et interactions bactériennes | 9 |
| 1.3. <i>Impact des biofilms et leurs applications.....</i> | 11 |
| 1.3.1. Impact négatif des biofilms | 11 |
| 1.3.2. Impact positif des biofilms et applications | 12 |
| SECTION 2 : LA BIO REMEDIATION ET SON CONTROLE ELECTRIQUE..... | 14 |
| 2.1. <i>La bio remédiation et utilisation de biofilms</i> | 14 |
| 2.2. <i>Etude de bactéries dépolluantes</i> | 15 |
| 2.3. <i>Méthodes de contrôle électrique sur site.....</i> | 18 |
| SECTION 3 : LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM) ET SON APPLICATION AUX OBJETS BIOLOGIQUES | 22 |
| 3.1. <i>La microscopie à force atomique</i> | 22 |
| 3.1.1. Historique | 22 |
| 3.1.2. Principe général..... | 23 |
| 3.1.3. Les forces d'interactions pointe-surface..... | 25 |
| 3.1.4. Les modes d'utilisation de l'AFM | 25 |
| 3.1.5. La cartographie de forces..... | 27 |
| 3.2. <i>Application de l'AFM aux objets biologiques</i> | 29 |
| 3.2.1. Objets biologiques observés par AFM | 30 |
| 3.3. <i>Immobilisation bactérienne pour imagerie AFM en milieu liquide.....</i> | 34 |
| SECTION 4 : DERIVES DE L'AFM | 37 |
| 4.1. <i>Les différents dérivés des pointes AFM</i> | 38 |
| 4.2. <i>Couplage de l'AFM à la microscopie électrochimique (SECM).....</i> | 38 |
| Fabrication des sondes AFM-SECM..... | 39 |
| 4.2.1. Les sondes AFM-SECM « artisanales » | 39 |
| 4.2.2. Les sondes AFM-SECM « micro-fabriquées »..... | 39 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 41 |

Synthèse bibliographique

Section 1 : Les Biofilms

1.1. Définition d'un biofilm

Un biofilm peut être défini comme une communauté de microorganismes, agrégés en micro colonies, incluse dans une matrice protectrice lui permettant d'adhérer à une surface. L'ensemble peut former des amas dont l'épaisseur peut atteindre plusieurs micromètres voire quelques millimètres [1]. L'organisation en biofilm est le mode de vie naturel de la majorité des microorganismes, spécialement en milieu hostile [2]. Cette organisation des microorganismes en biofilm a été découverte par Van Leeuwenhoek au 17^{ème} siècle qui l'a observé sur la surface de dents. Par la suite, au 20^{ème} siècle, Claude E. Zobell a développé la connaissance des biofilms, en particulier l'idée d'attachement bactérien [3].

Le développement et l'adhésion du biofilm peut se faire sur une surface vivante ou pas, allant des muqueuses de l'organisme, aux roches ou canalisations industrielles, en contact avec un liquide ou l'air, ou encore à l'interface liquide/air.

Au sein de ce biofilm, les microorganismes excrètent une matrice composée essentiellement d'exopolymères, i.e. substances polymériques extracellulaires (EPS) et qui joue un rôle essentiel dans la stabilité du biofilm et ses propriétés (densité, porosité, élasticité et activité métabolique). Cette matrice peut aussi contenir d'autres molécules organiques et inorganiques (ADN, protéines, métaux lourds...) [4].

1.2. Etapes de développement d'un biofilm et interactions bactériennes

Une succession d'étapes mènent à la formation d'un biofilm.

1.2.1. Etapes de développement d'un biofilm

Un biofilm se forme en plusieurs étapes, comme décrit dans la figure 1 :

* étape 1: Les bactéries planctoniques évoluant librement dans le milieu liquide, s'approchent de la surface.

* étape 2 : Ces bactéries entrent en contact avec la surface et s'y attachent, cette adhésion initiale peut être réversible.

* étape 3 : Les bactéries s'ancrent à la surface et consolident leur adhésion par la synthèse de composés polymériques extracellulaires. La colonisation du support s'effectue par

multiplication et agrégation des cellules en micro-colonies pour former le biofilm initial. L'adhésion devient alors irréversible.

* étape 4: C'est l'étape de la différenciation, l'ensemble évolue vers un biofilm complet où diverses protéines et enzymes secrétées par les bactéries constituent un composant structurel important.

* étape 5: Le biofilm devient mature et riche en nutriments et molécules signal avec une organisation encore mal comprise. Cependant les connaissances progressent : très récemment, des mécanismes interconnectés, de contrôles locaux et globaux dans le biofilm, ont été mis en évidence [5], [6].

* étape 6 : En fin de maturation, le biofilm se rompt, cette étape est appelée « sloughing » en référence à la mue des serpents, en répandant des bactéries qui retournent à l'état planctonique, certaines peuvent reformer plus loin un autre nouveau biofilm et reprendre l'étape 1 du cycle.

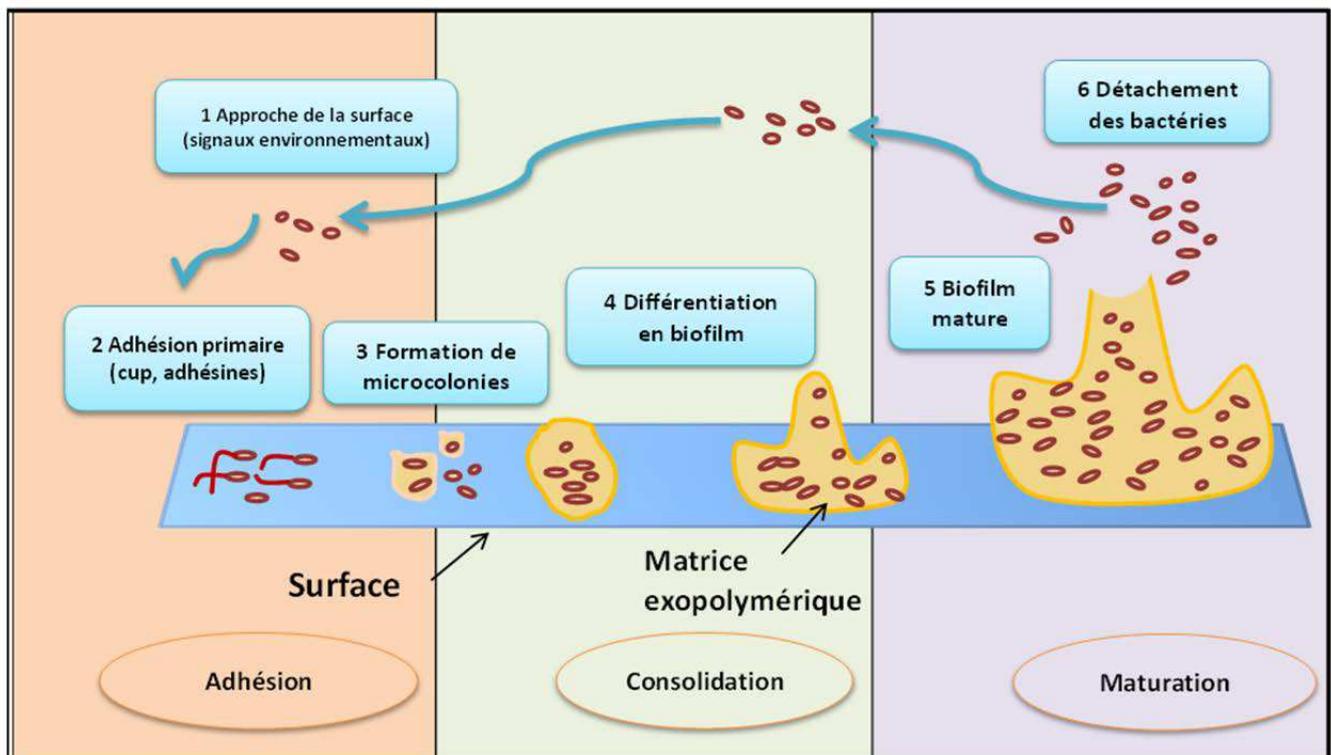


Figure 1 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm : 1. Approche de la surface ; 2. Premières étapes d'adhésion ; 3. Formation de micro-colonies ; 4. Différenciation et consolidation du biofilm ; 5. Maturation du biofilm puis (6) relargage de bactéries dans le milieu liquide.

1.2.2. Adhésion primaire et interactions bactériennes

- **Adhésion primaire**

Parmi toutes ces étapes, les étapes 1 et 2, pourtant étapes clés car essentielles pour la suite de la formation du biofilm, restent mal comprises. En effet, et avant même que les bactéries ne viennent au contact de la surface, futur support du biofilm, un ensemble de mécanismes favorisent leur futur développement. Ils consistent en un ensemble de forces dynamiques (déplacement des bactéries dans le milieu liquide et rapprochement aléatoire de la cellule vers le support), chimiotactisme (rapprochement spécifique des bactéries de la surface, grâce à des récepteurs de la paroi bactérienne), propriétés physicochimiques et forces non spécifiques (électrostatiques, Van Der Waals). Des éléments bactériens tels que les flagelles peuvent être essentiels au rapprochement par un mécanisme de « nage ». Ces phénomènes vont exercer un effet d'attraction-répulsion entre la surface et les bactéries en liberté au voisinage de cette dernière. Aussi, un mélange complexe de protéines, glycoprotéines et nutriments organiques (provenant de la décomposition de matière organique, de l'excrétion d'organismes vivants ou de la lyse de micro-organismes), entrent en jeu pour former un film sur la surface. Celle-ci devient alors un milieu idéal pour la croissance bactérienne à venir [7].

Une fois les bactéries en contact avec la surface, différents appendices cellulaires entrent en jeu. Ces appendices peuvent être des pili ou des flagelles. Les pili (ou fimbriae) se situent à la surface de la paroi bactérienne et ont une structure protéique pillinée et ne peuvent pas être observés par microscopie optique (courts et fins); ils sont impliqués dans l'attachement des bactéries aux cellules (muqueuses par exemple, ce qui en fait un facteur de virulence) et aux interfaces. Les flagelles, quant à eux, naissent de la membrane cytoplasmique et ont une structure rigide, ondulée, qui est composée d'une protéine appelée « flagelline » ; ces flagelles représentent des filaments longs et en forme d'hélice permettant la mobilité bactérienne (si placés à l'extrémité de la bactérie -mobilité polaire-, si répartis au hasard autour de la cellule -mobilité préritrice-) [8]. Dans le cadre du biofilm, ces appendices sont utilisés de différentes manières, par exemple, la bactérie détectant l'entrée en contact avec la surface, peut réduire la synthèse des flagelles (devenus inutiles) et développer les pili importants dans l'interaction avec le support et le développement de micro colonies [9]. Aussi, les cellules engagées dans ce processus, expriment des enzymes qui permettent la sécrétion d'exopolysaccharides et de protéines qui favorisent l'expansion de la matrice formant le biofilm[10].

- **Interactions bactériennes**

Les bactéries ont toujours été considérées comme des organismes solitaires asociaux, jusqu'à ce que certains chercheurs s'y intéressent de plus près, considérant qu'un organisme aussi petit, ne pouvait pas avoir un tel impact s'il agissait seul de façon isolée. A partir de ce moment-là, des interrogations sur les interactions entre les cellules bactériennes ont vu le jour. Et il est apparu que les bactéries, organismes unicellulaires, ont la capacité de communiquer entre elles pour se comporter comme un seul organisme multicellulaire pour s'adapter aux conditions environnementales. Elles utilisent différents protocoles de communication (« langages ») qui leur permettent de coordonner leur développement et d'assurer leur défense.

Ces « langages » restent mal compris. Beaucoup d'études sont menées pour mieux comprendre cette communication, afin de favoriser le développement de biofilms et en tirer profit, ou au contraire pour inhiber leur développement (« intercepter les échanges de l'ennemi ou couper les communications entre deux bataillons sont de vieilles tactiques militaires. Pour lutter contre les bactéries, il serait également très utile de connaître leur code de communication et d'interférer dans leurs échanges », Bonnie Bassler et Douglas Higgins, Princeton University, USA).

L'un des mécanismes les plus connus, est le système « quorum sensing » (QS) qui est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices, les « auto-inducteurs ». Lorsqu'un certain seuil de concentration est atteint, ils interagissent avec un régulateur transcriptionnel, qui induit une expression spécifique (transfert de gènes, sporulation...)[11]. Il s'agit là d'un moyen de communication extrêmement sophistiqué. Par exemple, dans l'intestin humain, des bactéries peuvent se développer de façon inoffensive jusqu'à ce que leur système « quorum sensing » leur indique que leur nombre est suffisant pour faire face au système immunitaire de l'organisme occupé, et ce n'est qu'à ce moment-là qu'elles deviennent virulentes (excrétion de toxines ou d'hémolysines capables de détruire les globules rouges) [12]. Le quorum sensing est donc un système ingénieux, grâce auquel les bactéries s'organisent. Tant qu'elles n'ont pas atteint un effectif ou 'quorum ' suffisant, les bactéries ne développent aucune forme de virulence, et dès qu'elles ont un signal positif, grâce au mécanisme du quorum sensing, elles enclenchent d'autres gènes, d'autres processus métaboliques et expriment, par exemple, des molécules virulentes [13].

Une autre forme de communication bactérienne intercellulaire a été découverte récemment, en 2011, celle d'une communication directe (contrairement à la communication par QS, décrite précédemment, qui elle se fait à distance par des médiateurs chimiques), par des ponts microscopiques ou nanométriques entre cellules bactériennes appelés « nanotubes » (figure 2, [14]). Des connections entre bactéries peuvent être établies par des pili sexuels qui jouent un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne : transmission de plasmides codant un caractère (pouvoir pathogène, résistance aux antibiotiques, synthèse de protéines...) d'une bactérie mère à une bactérie fille. Ces ponts permettent le transfert de nombreuses molécules, et se font même entre espèces différentes.

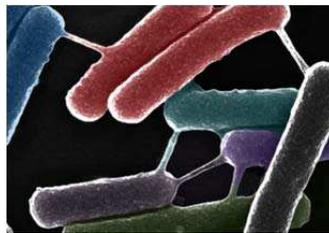


Figure 2 : Nouveau type de communication bactérienne via des nanotubes chez *Bacillus subtilis* [14].

1.3. Impact des biofilms et leurs applications

L'organisation des bactéries en biofilm est une arme redoutable, les rendant plus fortes et plus efficaces face à l'environnement plus ou moins hostile dans lequel elles évoluent, comparée aux bactéries évoluant sous forme planctonique [15].

Les biofilms peuvent être source de contaminations indésirables ou au contraire peuvent être bénéfiques et utilisés en conséquence.

1.3.1. Impact négatif des biofilms

Les biofilms constituent fréquemment un problème sanitaire, industriel et écologique. En effet, la virulence des bactéries et les problèmes qu'elles occasionnent sont fortement liés à leur mode de développement sous forme de biofilm. Car, une fois le biofilm formé, les bactéries sont protégées contre les systèmes de défense immunitaires et les traitements, qu'ils soient physiques ou chimiques (désinfectants, détergents et antibiotiques). Les exemples pour l'illustrer sont abondants.

Tout d'abord, dans le secteur médical, on peut citer les biofilms pathogènes qui se forment sur des tissus humains et qui sont impliqués dans de nombreuses maladies infectieuses

(mucoviscidose, caries dentaires, otite...). Le mode de développement des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* par exemple en biofilm dans les alvéoles pulmonaires, les protège des traitements antibiotiques [16] ainsi que du système immunitaire de l'organisme hôte colonisé [17]. Aussi, il existe une autre forme de biofilms tout aussi problématique, celle qui se forme sur l'instrumentation médicale constituant une source de contamination et de développement d'infections nosocomiales (60 % des maladies nosocomiales ont pour origine les biofilms qui se développent dans le milieu hospitalier).

Dans l'industrie, les biofilms peuvent être responsables de la bio détérioration des matériaux, par l'entartrement des canalisations ou encore le dépôt sur les échangeurs thermiques des installations gazières et pétrolières entraînant de grandes pertes économiques. Dans les industries agro-alimentaires, ces biofilms représentent une menace sur la qualité sanitaire ainsi que les qualités organoleptiques des produits fabriqués [18].

Enfin, dans l'environnement, l'impact des biofilms se traduit par le déséquilibre de certains écosystèmes. En effet, les biofilms peuvent se développer excessivement suite à la présence d'un niveau élevé de certains nutriments (effluents industriels par exemple) et pour métaboliser ces derniers ils consomment plus d'oxygène, en privant ainsi d'autres organismes qui partagent le même écosystème de leur source principale de vie. Ainsi, se créent, ce qui est appelé des « zones mortes » (phénomène d'« anoxie »). Ce problème revêt une ampleur mondiale comme on peut le voir sur la figure 3.



Figure 3 : Les plus importantes zones mortes du globe terrestre (« World Resources Institute », Jonathan Lash 2007).

1.3.2. Impact positif des biofilms et applications

Outre tous ces aspects négatifs, qui sont les plus évoqués quand il s'agit de biofilms, des aspects positifs existent. Certaines propriétés bactériennes peuvent être utilement exploitées afin d'en tirer avantage dans de nombreux domaines. Cet angle est encore nouveau, mais est en pleine expansion et constitue l'alternative recherchée dans beaucoup de secteurs.

On peut citer dans ce cadre les biofiltres, technique d'épuration biologique à cultures fixées, où les biofilms sont utilisés pour leur capacité de filtration dans les procédés de traitement des eaux usées. Les bactéries formant le biofilm éliminent la pollution soluble présente dans l'eau à traiter et hydrolysent puis assimilent les matières particulaires déposées sur le support de filtration, par une réaction d'oxydation des composés en présence d'oxygène conduisant à la formation de biomasse, d'eau et de produits minéraux. Ainsi ces polluants sont utilisés comme source de carbone et d'énergie pour les bactéries contenue dans le biofilm du biofiltre.



Dans le milieu industriel, les biofilms sont utilisés pour de nombreuses applications, on peut en citer le réacteur biologique à lit fluidisé (FBBR –Fluidized Bed Biological Reactor) qui est un réacteur où un biofilm est développé sur des supports, qui sont par la suite fluidisés grâce à la vitesse de passage de l'effluent traité dans une colonne [19]. Ainsi, le biofilm intervient en détoxification (bioaccumulation des métaux), plus particulièrement dans le traitement des déchets riches en matière organique (par méthanisation anaérobie).

Une autre application récente et très intéressante a vu le jour, celle de « piles à combustible microbiennes » (PACM) qui sont généralement désignées par l'acronyme « MFC » "microbial fuel cell" Des biofilms bactériens assurent la conversion directe de matières organiques en énergie électrique ou catalysent des réactions électrochimiques (catalyse électro-microbienne) [20].

Les biofilms sont aussi utilisés comme bio-indicateurs, où ils jouent le rôle de marqueurs du degré de pollution d'un site donné [21] ou encore comment acteur contre la pollution en dégradant les polluants présents, c'est ce qui est nommé « biodépollution » ou encore « bio-remédiation ».

Section 2 : La bio remédiation et son contrôle électrique

2.1. La bio remédiation et utilisation de biofilms

La bio-remédiation s'est imposée aujourd'hui, et le sera de plus en plus dans les prochaines années, à cause de l'équilibre naturel rompu par l'industrialisation grimpante depuis le 19^{ème} siècle et l'activité humaine croissante (agricole et urbaine). En effet, le rejet industriel massif d'éléments toxiques dans différents milieux naturels (sol, eau, air) couplé à un seuil de rejet sociétal, a rendu nécessaire l'emploi de moyens performants pour dépolluer l'environnement impacté. Le marché des sites et sols pollués est en constante augmentation depuis la dernière décennie. A titre d'exemple, le chiffre d'affaire de ce secteur d'activité en France a été estimé à plus de 550 millions d'euros pour l'année 2006 et l'Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (Ademe), qui est chargée par les pouvoirs publics de mettre en sécurité des sites dits "à responsables défaillants", est intervenue sur 136 sites en 2012, contre 40 en 2007.

Il existe différentes méthodes de dépollution, hors site, sur site et in-situ. Ces méthodes nécessitent, pour les deux premières, l'excavation de la terre avec ou sans traitement sur place alors que, pour la dernière, la dépollution est réalisée sans bouleversement de la topographie du site. La dépollution se fait par des méthodes de remplacement (déplacer le sol contaminé et le remplacer par de la terre propre), par des traitements physico-chimiques (injection de liquide ou de gaz sous pression capable de dissoudre les polluants présents sur le site à décontaminer), ou encore par injection et extraction des vapeurs (pour les polluants volatils).

Ces méthodes sont extrêmement coûteuses et très invasives car elles modifient les propriétés du milieu, d'où l'orientation croissante vers des techniques de traitements biologiques in situ.

Parmi celles-ci on peut citer

1. Le « sparging-biosparging » consistant à passer les polluants contenus dans une nappe d'eau souterraine en phase gazeuse par injection d'air ; cet air extrait, chargé de polluants, est ensuite traité.
2. La « bioaugmentation/biostimulation » consistant à dégrader les polluants par des microorganismes endogènes (du milieu) ou exogènes (étrangers au milieu) stimulés par des nutriments ou de l'oxygène.

Ces deux techniques représentent respectivement 25 et 12,5 % de la totalité des eaux souterraines traitées [22].

La biodépollution (ou bioremédiation) consiste à utiliser des organismes vivants, plus particulièrement des bactéries ou des biofilms bactériens, pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels. Ces systèmes bactériens ont cet avantage d'éliminer un composé, avec comme seuls rejets, des produits inoffensifs tels que l'eau, le dioxyde de carbone, le méthane, l'hydrogène, etc.

Le métabolisme microbien étant souvent limité par des facteurs environnementaux (pH, pression osmotique, pression mécanique ou hydrostatique, température, oxygène), l'objectif de la biodépollution est d'optimiser ces facteurs afin d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes pour accélérer la décontamination des sites pollués.

La réussite de la mise en œuvre de procédés biologiques *in situ* dépend de plusieurs facteurs, en particulier :

- la présence de bactéries capables de biodégrader les polluants présents,
- la possibilité de suivre dans le temps les paramètres indicateurs de la biodégradation (dégradation des polluants), mais également le suivi des modifications des conditions du milieu (pH, O₂,...), des produits de dégradation et des activités bactériennes.

2.2. Etude de bactéries dépolluantes

Comme mentionné ci-dessus, la réussite d'une biodépollution repose sur la présence de bactéries capables de biodégrader les polluants présents.

Les bactéries, organismes vivants, ont longtemps été considérées incapables de se développer dans des milieux hostiles (hautes températures, fortes pressions etc). Plus récemment ont été découvertes des extrêmophiles, organismes vivants dans des milieux où toute forme de vie était supposée être exclue. Ces archaea ou bactéries arrivent à se développer à des températures extrêmes de l'ordre du 100°C pour les « hyperthermophiles » ou de 0°C pour les « psychrophiles », des fortes pressions de l'ordre de 1100 atmosphères pour les barophiles ou « piezophiles » (bactérie « MT 41 » [23]), en milieu très acide pour les « acidophiles » ou alcalins « alcalophiles », ou enfin celles découvertes en milieu radioactif, les bactéries radiorésistantes de type *Deinococcus radiodurans* [24]

Aussi, dans les sites contaminés par des éléments toxiques, des bactéries, résistant aux polluants présents et qui réussissent à les métaboliser, ont été isolées. De nombreux travaux

de recherche ont été menés afin de les caractériser, identifier les produits qu'ils avaient la capacité de dégrader, avec pour objectif de les utiliser en bio-dépollution.

Parmi les sites à dépolluer figurent les terrains contaminés par des hydrocarbures, qui font l'objet du projet auquel nous participons. En effet, et comme mentionné dans l'avant-propos, notre travail s'inscrit dans le cadre du projet ANR- BioPHY acronyme pour « Optimisation de procédés de BIODépollution des eaux souterraines contaminées par des hydrocarbures par un monitoring géoPHYsique et analyse de gaz en ligne », issu du programme ECOTECH 2011, qui se propose de développer une méthodologie de surveillance d'une biodépollution de sol pollué par les hydrocarbures à l'aide de méthodes intégratrices et non destructives. Cette méthodologie repose sur un suivi continu dans le temps de l'activité bactérienne et des produits injectés (air, vapeur, nutriments). En effet, la pollution des sols par des composés pétroliers, phénomène préoccupant, est assez fréquente puisque souvent associée au transport d'hydrocarbures (la quantité d'hydrocarbures répandus au cours du transport par les pipe-lines souterrains se situe autour de $60 \text{ m}^3 / 1000 \text{ km}$), ou encore au niveau des stations-service (des fuites sur les cuves de stockage ou sous forme de faible pollution se produisant durant le remplissage des réservoirs des véhicules mais qui a un impact important vu son aspect chronique). Cette décharge vers les eaux terrestres constitue une grande menace, vu la grande solubilité de différentes molécules composant ces rejets. Aux Etats-Unis, les fuites de pétrole signalés sont au nombre de 9000/an ; en moyenne 77% sont traitées, laissant un cumul de 110 000 fuites non traitées en 2007. Quant aux friches industrielles contaminées par des hydrocarbures elles sont estimées à 200 000 à la même année-[25]. Tout ceci impose donc le développement d'outils adaptés à la dépollution.

Ainsi, et dans le cadre du projet ANR une collaboration a été lancée avec l'IFP-EN (Institut Français de Pétrole-Energies Nouvelles) en particulier avec les équipes de microbiologie environnementale de l'IFP-EN, Mme Françoise Fayolle-Guichard et Mr Yves Benoît, afin de bénéficier de leur savoir-faire en matière de microorganismes capables de biodégrader les mélanges complexes de substances contenant des hydrocarbures natifs et des additifs couramment utilisées dans les composés pétroliers. En effet, de nombreux travaux ont été menés par cette équipe afin d'isoler et caractériser des espèces capables de dégrader ces différents produits toxiques.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence des espèces bactériennes capables de dégrader des additifs pétroliers extrêmement toxiques, « *Aquicola tertiaricarbonis* » pour le MTBE –

methym *t*-butyl ether-[26], « *Gordonia terrae* » pour l'ETBE –ethyl *t*-butyl ether, le MTBE et le TAME –*t*-amyl methyl ether-[27], « *Mycobacterium austroafricanum* » pour les carburants oxygénés [28]. Aussi, des souches « *Rhodococcus* » ont été identifiées et caractérisées pour leur pouvoir à dégrader l'ETBE, MTBE et TAME [29].

Par exemple, les bactéries *Rhodococcus wratislaviensis* et *Rhodococcus aetherivorans* ont été isolées à partir d'un consortium bactérien dégradant une mixture de 16 composés pétroliers (appartenant à la famille des alcanes, les hydrocarbures mono aromatiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les éthers ou nitrates). Le taux de dégradation ((composé résiduel témoin – substrat résiduel essai) / (composé résiduel témoin) x 100) et le rendement de minéralisation (rapports molaires : ((mole C_{CO2essai} – mole C_{CO2témoin}) / mole C_{Substrat consommé}) x 100) de ces composés ont été testés individuellement (tableau 1) [30].

Tableau 1 : Dégradation et minéralisation de 16 composés testés individuellement par *R. wratislaviensis* IFP 2016 et *R. aetherivorans* IFP 2017 (Adapté de [30]).

| Composé testé | <i>R. wratislaviensis</i> IFP 2016 | | <i>R. aetherivorans</i> IFP 2017 | |
|--|------------------------------------|--|----------------------------------|--|
| | Dégradation (en %) | Rendement de minéralisation (en %) | Dégradation (en %) | Rendement de minéralisation (en %) |
| Benzène | 64.9 | 24.9 | 4.1 | 0 |
| Ethyl benzène | 95.2 | 46.6 | 0 | ND |
| Toluène | 99.7 | 65.8 | 0 | ND |
| <i>m</i>-Xylène | 0 | ND | 0 | ND |
| | 63.3* | 100* | | |
| <i>p</i>-Xylène | 0 | ND | 0 | ND |
| | 52.1* | 0* | | |
| <i>o</i>-Xylène | 13.5 | 0 | 0 | ND |
| | 48.1* | 42.1* | | |
| Cyclohexane | 0 | ND | 0 | ND |
| | 100* | 50.4* | | |
| Octane | 97.5 | 44.9 | 21.4 | 61.9 |
| Hexa décane | 32.1 | 100 | 96.3 | 20.1 |
| Isooctane (2,2,4- triméthylpentane) | 16.8 | 0 | 17.3 | 5.3 |

| | | | | |
|---|-----|------|------|------|
| Cyclo hexanol | 100 | 43.6 | 100 | 46.7 |
| MTBE (methyl tert-butyl Ether) | 3.2 | 0 | 22.3 | 0 |
| ETBE (ethyl tert-butyl Ether) | 0 | ND | 100 | 18.2 |
| TBA (tert-butyl alcohol) | 0 | ND | 0 | ND |
| 2-EHN (2-ethylhexyl nitrate) | 0 | ND | 26.2 | 12 |
| Naphtalène | 100 | 36.4 | NT | NT |

*Produit dilué dans du HMN (2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane) avant d'être ajouté (dans les autres essais, le produit est ajouté directement).

La souche « *Rhodococcus wratislaviensis* » CNCM I-4088, a été brevetée par l'IFP-EN pour ses capacités à dégrader des mélanges complexes d'hydrocarbures en solution dans l'eau [31]. Il n'existe donc, à priori, plus beaucoup de zones d'incertitudes quant à la dégradabilité bactérienne des hydrocarbures et des additifs pétroliers, par contre il est difficile de connaître avec précision les cinétiques de dégradation, ainsi que les performances des micro-organismes sur site et dans les conditions réelles, du fait du manque d'outils adaptés au terrain. D'autre part, la simulation des processus sur site par des expériences de laboratoires est trop aléatoire pour pouvoir apporter des informations fiables.

2.3. Méthodes de contrôle électrique sur site

Depuis une dizaine d'années, les méthodes géophysiques appliquées aux problèmes environnementaux font l'objet de nombreux travaux de recherche. Des expériences de monitoring géophysique durant une dépollution de nappe ont été menées [32], montrant qu'il était possible de suivre, par ces mesures, le panache d'un oxydant chimique (permanganate de potassium). D'autres travaux ont montré que pendant une opération d'« air-sparging » (injection d'air dans une zone saturée favorisant l'extraction physique de polluants volatils présents dans l'eau) sur du jet fuel (carburant d'aviation), le potentiel spontané augmentait [33]. Le potentiel spontané (PS) est un potentiel électrique mesuré de façon passive à la surface de la terre, il est utile pour localiser et quantifier les flux d'eau et les propriétés

hydrauliques des aquifères, mais aussi les panaches de polluants. Des mesures électriques sur site, entre forages, ont aussi montré que pendant l'injection de vapeur d'eau dans un calcaire fracturé pour traiter les organochlorés, les zones chaudes où se propageait la vapeur étaient visibles à cause de la chute de la résistivité corrélée à l'augmentation de la température [34].

Un lien a été établi entre les processus de dégradation et la conductivité électrique des sols, dans le cadre de mesures sur des sites contaminés par des hydrocarbures [35]. Concernant l'activité bactérienne, il était inconcevable, encore il y a quelques années, de penser que les processus bactériens pouvaient avoir un impact sur les signatures géophysiques. Pourtant, les cellules bactériennes ont bien des propriétés électriques, et même magnétiques (les bactéries magnéto tactiques). Ainsi, les méthodes électriques et magnétiques de mesures (méthodes de routine en géophysique) peuvent potentiellement être adaptées à l'investigation de processus pilotés par les bactéries. Ceci a été exploré par des études en laboratoire afin d'évaluer leur impact sur le milieu géologique et les propriétés géophysiques, principalement les mesures électriques. Ces dernières peuvent être modifiées par des processus physico-chimiques indépendants de toute activité microbienne, mais aussi par des processus liés au métabolisme cellulaire de la communauté microbienne vivante. Il a été démontré aussi, au niveau de colonnes en laboratoire, qu'il y avait une différence significative entre colonnes bio stimulées et colonnes sans inoculum bactérien (figure 4), et que la croissance microbienne et la formation d'un biofilm peuvent être détectées par des mesures de conductivité ([36], [37], [38]).

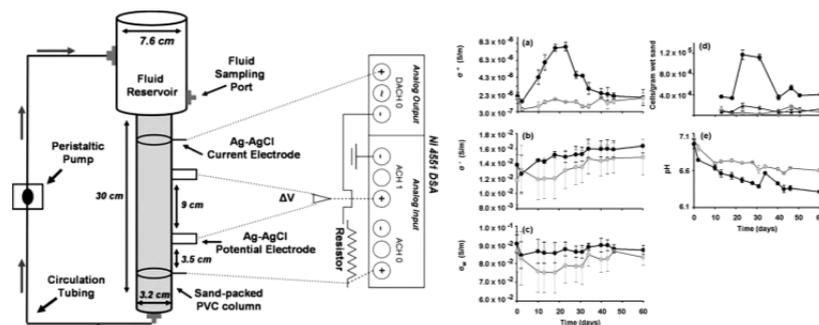


Figure 4 : Différence de signature électrique entre colonnes bio stimulées (en noir) et colonnes non bio stimulées (en gris) détectée par des mesures de conductivité [36].

Ainsi l'impact des bactéries peut se traduire de différentes manières :

- Forts gradients oxydo-réductifs au niveau de la surface piézométrique induits par des bactéries ou biominéraux engendrant un transfert d'électrons, « géo batterie » [39], [40].

- Acides organiques, produits du métabolisme microbien, peuvent induire une altération minérale, ou des bio minéralisations qui précipitent des sels métalliques détectables par la polarisation provoquée spectrale [41].
- Ou encore, plus récemment, la révélation de filaments protéiques extracellulaires, chez les bactéries, de taille nanométriques, appelés « nanowires » à grande conductivité électrique (figure 5), [42], [43], [44].

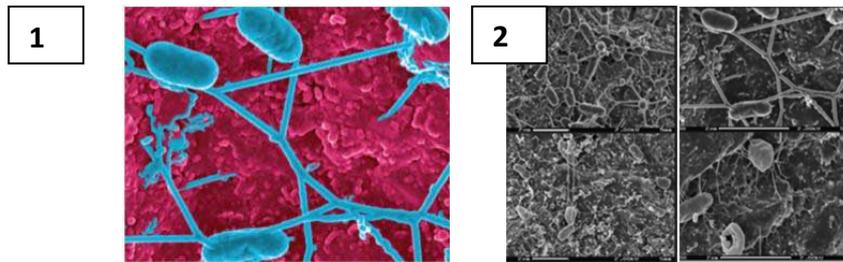


Figure 5 : Bactéries de type « *Shewanella. oneidensis* » connectées par les « nanowires » (1 [44], 2 [42]).

Un modèle conceptuel a ainsi été développé, schématisant l'effet "électro-redox" induit par l'activité des bactéries qui produit des anomalies sur le potentiel spontané [45] . Dans ce modèle les « nanowires » (filaments protéiques extracellulaires) et/ou biominéraux orientés (précipitation de particules métalliques résultant de l'activité bactérienne), jouent le rôle de conducteurs pour les électrons produits dans la zone de réduction (anode) et consommés dans la zone d'oxydation (cathode). Un courant électrique est alors produit de la zone « cathode » à la zone « anode » de ce système. Ainsi, dans ce modèle, les donateurs d'électrons (matière organique) et les accepteurs (O_2 , nitrate, sulphate) sont associés en un système anode et cathode (figure 6, [46]).

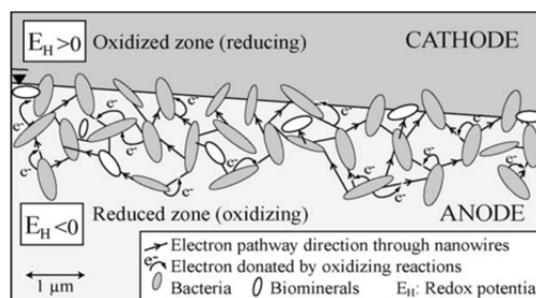


Figure 6 : Modèle conceptuel décrivant l'effet électrique généré par l'activité redox des bactéries via les biominéraux et les « nanowires » [46].

Aussi, des travaux sur la dégradation du phénanthrène ont démontré que les biofilms formés par les bactéries modifiaient la résistivité complexe, de manière plus importante que par les bactéries seules non impliquées dans un biofilm [47].

L'ensemble de cette activité bactérienne et sa signature sur les mesures électriques est maintenant confirmée, mais l'origine exacte du ou des processus responsables de ces

variations de signaux reste mal comprise. Il est très important de lever le flou sur cette question pour la résolution de différents problèmes à fort potentiel de développement industriel, par exemple pour la détection de la pollution en sortie de sites de stockage de déchets ou encore le contrôle sur site et en temps réel du degré d'avancement d'une biodépollution.

Pour l'étude de cette problématique, la démarche actuelle est principalement macroscopique. Les méthodes chimiques et physiques, utilisées pour l'obtention des informations concernant les différents processus de type oxydo-réductif ne permettent l'accès qu'à des valeurs moyennées sur des volumes très importants par rapport à ceux typiques des bactéries. Dans une revue récente [36], les auteurs concluent que "de grandes lacunes restent à combler, entre l'échelle où il a été prouvé que le transfert des électrons se faisait par les bactéries et l'échelle à laquelle les mesures géophysiques sont effectuées (centimètre-mètre). Ceci devrait être un des domaines les plus importants des recherches futures".

Seules des méthodes d'investigation locales, permettant d'accéder aux dimensions caractéristiques des cellules bactériennes (micromètre et en deçà) peuvent apporter les informations requises. Des études par microscopie électronique à balayage (MEB) ou microanalyse par rayons X ont permis une avancée importante dans la compréhension des processus oxydo-réductifs pilotés par des bactéries [48]. Mais les conditions opératoires restent très éloignées des conditions physiologiques naturelles des bactéries. Elles consistent à effectuer des prélèvements de matière dans le milieu réactionnel et de leur faire subir de nombreux traitements agressifs. En effet, ces méthodes, nécessitent une préparation préalable de l'échantillon, qui consiste à les fixer (tuer les cellules), les nettoyer chimiquement et les déshydrater (les cellules ne doivent contenir aucune trace d'eau). Ces méthodes, permettent certes d'observer les bactéries avec une grande résolution, mais dans des conditions très différentes des conditions de vie naturelles des bactéries, ce qui est un biais très important aux informations obtenues.

Contrairement à toutes ces méthodes de microscopies permettant d'aller à de très petites échelles dans l'exploration d'objets biologiques, la microscopie à force atomique (AFM) présente l'avantage de pouvoir travailler en milieu liquide, dans des conditions proches de l'état physiologique des bactéries.

Section 3 : La Microscopie à Force Atomique (AFM) et son application aux objets biologiques

3.1. La microscopie à force atomique

3.1.1. Historique

Certains relient l'invention de l'AFM à un instrument précurseur, le "Topografiner", développé par le physicien américain Russel Young en 1972 [49] et décrit par l'académie des sciences comme « le premier instrument qui fonctionne selon le principe du maintien d'une petite distance constante entre la surface d'un échantillon et celle d'un stylet pointu mécanique ». Mais, c'est bien l'apparition du microscope à effet tunnel (*Scanning Tunneling Microscopy* ou STM) en 1981, dans les laboratoires IBM à Zurich, développé par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, qui a révolutionné le domaine des microscopies classiques. Son fonctionnement repose sur l'apparition d'un courant tunnel lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre une pointe et un échantillon conducteur avec une distance très faible entre les deux. L'intensité de ce courant dépend de la densité électronique de la surface de l'échantillon, de la pointe et la distance entre les deux ; il est ainsi possible, en contrôlant l'intensité du courant tunnel, de retracer la topographie de l'échantillon à l'échelle atomique.

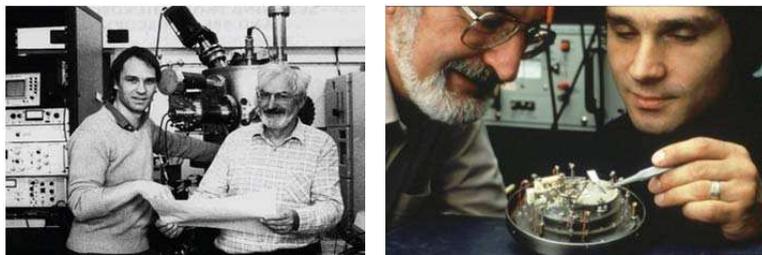


Figure 7 : Prix de Nobel de Physique décerné à Binnig et Rohrer en 1986 pour l'ensemble de leurs travaux sur le STM et AFM (Nobel partagé avec Ernst Ruska pour sa conception du microscope électronique).

Le STM, se limite donc aux échantillons conducteurs, mais la mise en évidence de forces d'interaction d'intensité variable en fonction de la distance pointe-échantillon, a permis l'introduction du Microscope à force atomique par G.Binnig, C.F. Quate et C. Gerber en 1986 [50], ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de physique (figure 7). Par la suite, une nouvelle méthode de détection basée sur un bras de levier optique a permis d'accélérer fortement le développement de l'AFM (Atomic Force Microscopy) [51], [52], comme un

nouveau type de microscopie à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon avec une précision nanométrique (figure 8).

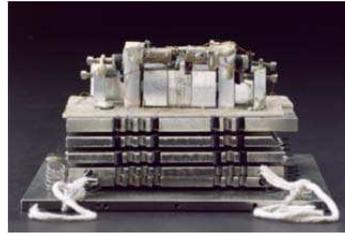


Figure 8 : Le premier microscope à force atomique, musée de la Science de Londres (« first atomic force microscope », science museum London).

3.1.2. Principe général

Comme mentionné précédemment, le développement de l'AFM dérive du développement du microscope à effet tunnel (STM). Contrairement à ce type de microscopie limité aux échantillons conducteurs, l'AFM présente le grand avantage de permettre l'exploration de tout type de surfaces. L'AFM appartenant à la famille des microscopes à sonde locale, son fonctionnement repose sur le déplacement, induit par une céramique piézoélectrique, d'une sonde ou pointe solide très fine, de taille nanométrique, au voisinage immédiat de la surface d'un échantillon (figure 9). Le champ de force qui s'établit entre l'extrémité de la pointe et quelques atomes de l'échantillon qui sont à sa proximité, est mesuré et puisqu'il est directement lié à la distance pointe-échantillon, il reflète le relief de ce dernier, c'est ainsi qu'est déduite la topographie de l'échantillon à une échelle nanométrique.

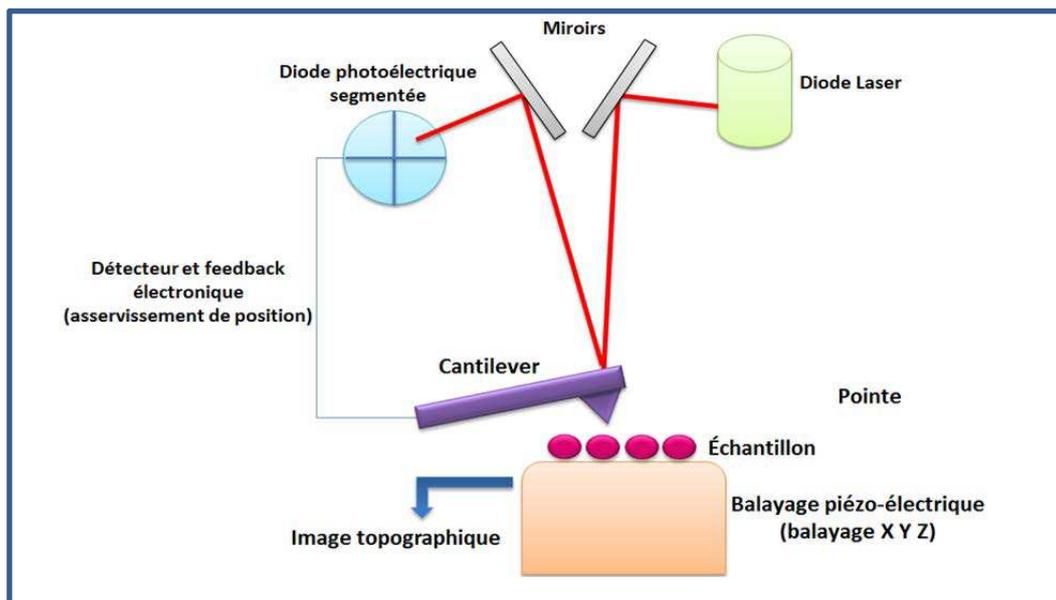


Figure 9 : Principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM).

Le levier utilisé est généralement en silicium ou en nitrure de silicium, et a typiquement des dimensions de l'ordre de : Longueur = 300 μm , largeur = 40 μm , épaisseur = 5 μm , il joue le rôle de ressort, et présente une pointe nanométrique à son extrémité appelée « la sonde ». Quand la pointe (ou sonde) est en interaction avec la surface, la force fléchit le levier, cette flexion est mesurée par la déviation du faisceau laser. Connaissant l'amplitude de cette déviation et la raideur du levier, il est facile d'évaluer la force qui s'établit entre la pointe et la surface.

Le levier est fixé à un ensemble de céramiques piézoélectriques, (matériau qui, soumis à une différence de potentiel, s'allonge ou se contracte suivant le signe de la tension appliquée) permettant de commander le déplacement de l'échantillon dans les trois directions de l'espace, doté d'une excellente stabilité et est très sensible (assurant des déplacements de l'ordre du picomètre 10^{-12} m). Ce système est associé à un dispositif électronique permettant de s'affranchir de toutes les vibrations parasites environnantes, point essentiel à cette échelle de travail. La déflexion du levier est mesurée par la méthode du levier optique (système optique élémentaire) : un faisceau laser est envoyé sur l'extrémité du levier et la position du faisceau réfléchi est détectée grâce à un photo-détecteur (photodiode) à quatre quadrants permettant de définir une position précise du spot de laser. Lorsque le faisceau réfléchi est dévié, l'intensité reçue par chacun des cadrans du détecteur change ; cette variation traduit donc une modification de position. Pour des faibles déflexions, il y a une relation linéaire entre le déplacement du levier et la différence entre les intensités reçues par les quadrants de la photodiode. La photodiode renvoie la valeur en intensité ainsi mesurée, correspondant à la déflexion, au bloc électronique. Comme le levier se déforme élastiquement, les déflexions enregistrées permettent d'avoir la topographie de surface de l'échantillon. L'acquisition de ces données ne se fait pas directement, mais par asservissement de la position de la pointe à une valeur de déflexion de référence, le « Setpoint ». Si la valeur mesurée est différente de la valeur de référence, l'électronique renvoie des tensions aux céramiques piézoélectriques, qui commandent le déplacement de la pointe, de manière à ce qu'elles se contractent ou se dilatent pour ramener la valeur de la déflexion instantanée à la valeur de référence (ce principe de fonctionnement par boucle de rétroaction, fonctionne selon une déflexion constante ou force constante, il s'agit là du premier mode de fonctionnement de l'AFM, le mode contact).

3.1.3. Les forces d'interactions pointe-surface

L'AFM est basée sur la mesure d'une force (F) ou de gradient de force ($\partial F / \partial z$) entre une sonde et la surface d'un échantillon. Les forces entrant en jeu durant les mesures AFM sont nombreuses et dépendent du type de pointe, de l'échantillon imagé et du milieu dans lequel est réalisée la mesure (air, liquide, vide). Elles sont de type attractif et de type répulsif elles peuvent aller jusqu'à une valeur de l'ordre du pico newton ($10^{-12}N$) (figure 10).

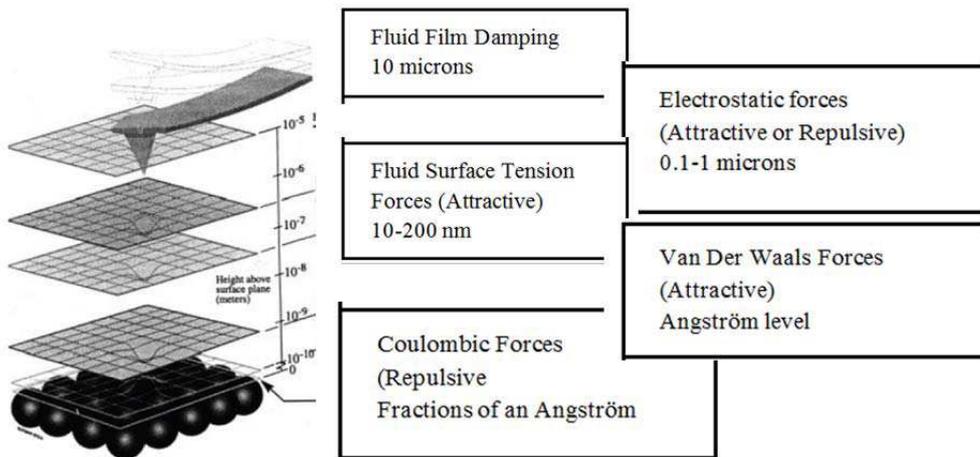


Figure 10 : Les différents types de forces entre la pointe AFM et la surface de l'échantillon (adaptée de [53],[54]).

Ainsi, loin de la surface c'est surtout les forces attractives dites de Van der Waals qui s'exercent, puis quand la pointe est à quelques nanomètres de la surface, ce sont des interactions répulsives à courte portée qui prédominent (figure 10).

3.1.4. Les modes d'utilisation de l'AFM

L'utilisation de l'AFM se décline en plusieurs modes, selon que la pointe soit en contact avec la surface ou pas, qu'elle fonctionne à la résonance du levier ou à fréquence nulle. Ces modes reposent sur des types d'interactions différents (figure 11).

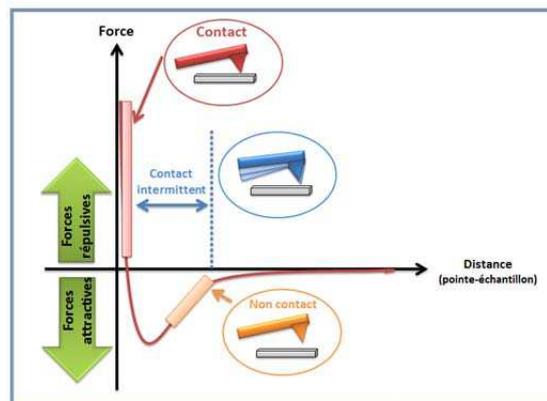


Figure 11 : Courbe d'interaction pointe AFM-surface de l'échantillon.

3.1.4.1. Le mode contact

Le mode contact, comme son nom l'indique, est un mode où la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon. Ce mode correspond donc au domaine des forces répulsives. La pointe est placée au contact direct de la surface de l'échantillon étudié, avec une consigne d'appui. Un équilibre est alors obtenu entre d'un côté la force d'appui exercée et les forces d'attraction de la pointe, et de l'autre les forces de répulsion qui apparaissent. Ce mode fonctionne exclusivement dans le domaine répulsif (figure 11). La déflexion du levier, avec la pointe à son bout, est ainsi maintenue constante pendant les mesures AFM par balayage de la surface de l'échantillon, et une cartographie de l'échantillon est réalisée délivrant des données sur la variation de la hauteur de l'échantillon (sa topographie et rugosité).

3.1.4.2. Le mode contact intermittent

Le mode de contact intermittent, appelé aussi mode « tapping », est un autre mode utilisé en imagerie AFM. Il consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre (f_0) de résonance (de l'ordre de la centaine de kHz), loin de l'échantillon, avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît (car la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait, en mode de modulation d'amplitude, sur l'amplitude d'oscillation du levier à une fréquence voisine de f_0 . (Différence avec mode non contact : les amplitudes d'oscillation sont généralement plus importantes ($> \text{nm}$), la pointe entre en contact avec la surface de l'échantillon, à l'extrémité de son oscillation). Ce mode oscille entre le domaine répulsif et attractif (figure 11), et il est usuellement destiné à l'imagerie de matériaux souples.

3.1.4.3. Le mode non-contact

Le mode non-contact est aussi appelé mode « résonnant ». Il fonctionne dans le domaine des potentiels attractifs de longue portée (figure 11) : le levier est excité à sa fréquence de résonance avec de petites amplitudes d'oscillation (quelques nanomètres) à une distance de l'échantillon de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, sans qu'il y ait contact entre la pointe et l'échantillon. En fonction du gradient de force perçu par la pointe, la constante de raideur effective du levier est modifiée, cette modification entraîne un décalage de sa fréquence de résonance. Ou bien, à l'inverse, à fréquence d'excitation constante du levier, le gradient de force modifie l'amplitude des oscillations qui peuvent à leur tour être mesurées. Ce mode est essentiellement utilisé sous vide.

3.1.5. La cartographie de forces

3.1.5.1. Courbe de force

La compréhension d'une courbe de force (figure 12) est essentielle pour comprendre la suite.

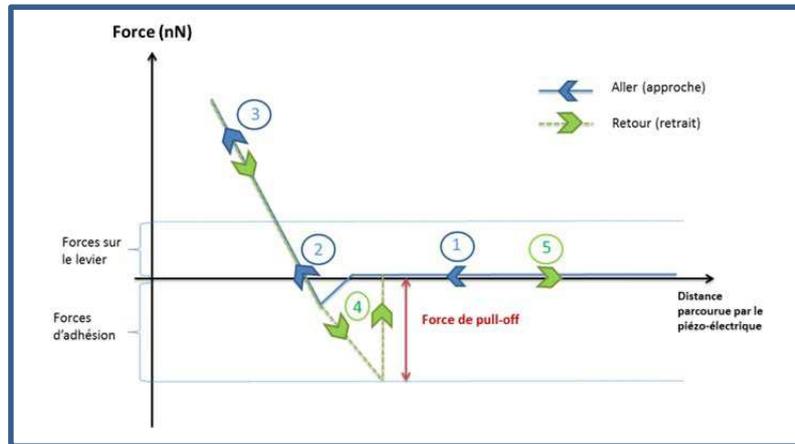


Figure 12 : Courbe de force typique donnant la variation de la force (typiquement en nN) en fonction de la distance parcourue par la céramique piézo-électrique. ① : le levier s'approche de la surface (flèches bleues) ; ② : le levier est attiré par le substrat par une force de type capillaire ; ③ la force est répulsive que ce soit en mode "approche" (flèche bleue) qu'en mode "retrait" (flèche verte) ; ④ : la pointe reste accrochée au substrat par les forces capillaires jusqu'à la rupture du pont capillaire ; ⑤ : courbe de retrait.

Il s'agit de la représentation de la force d'interaction entre la pointe et la surface en fonction de la distance les séparant. Le levier, ressort de constante de raideur très faible (de l'ordre de 0.1 N/m à 0.03 N/m, en fonction du type de levier) va présenter une déflexion. La force d'interaction est le produit de la sensibilité du système de détection optique de la flexion du levier (typiquement de l'ordre de quelques nanomètres/Volts) par la constante de raideur du levier (de l'ordre de quelques centièmes à dixièmes de Newtons/mètre).

Une représentation de l'interaction point-surface peut aussi être réalisée en représentant la force en fonction du temps, durant l'approche retrait de la pointe AFM à la surface de l'échantillon (figure 13).

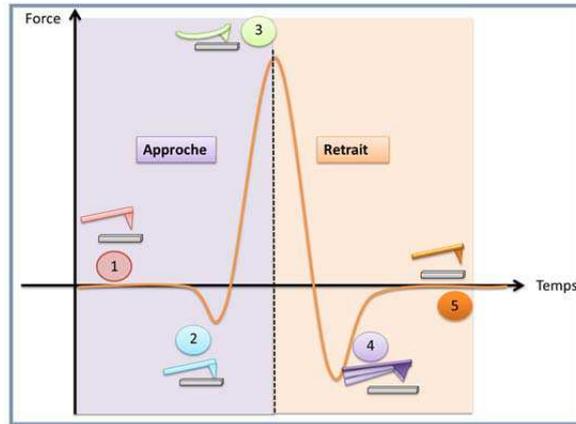


Figure 13 : Courbe d'interaction pointe-surface, représentant les forces s'exerçant entre pointe AFM et la surface de l'échantillon lors de l'approche-retrait pour imagerie AFM.

La courbe de force (figure 12), et les forces représentées lors de l'approche-retrait représentent la succession des étapes suivantes (13). Lors de l'approche de la pointe vers la surface. -1- la pointe est d'abord soumise à des forces attractives (essentiellement capillaires, de Van der Waals et électrostatiques), jusqu'à une distance très proche de la surface (quelques nanomètres) -2- A partir de cette distance, on passe d'un régime attractif à un régime répulsif (distance pointe-échantillon \searrow), quand cette force d'interaction croît, la flexion du levier croît en conséquence, jusqu'à ce que la modulation (position Z) atteigne un maximum (cette valeur est définie par le choix de la consigne imposée par l'opérateur)-3- il s'agit là de la valeur maximale de la force (utilisée pour le contrôle feedback). A partir de ce point le système électronique de commande, ordonne le retrait de la pointe, jusqu'à atteindre le « pull off point » qui correspond à un maximum d'adhésion (maximum de force d'adhésion) -4- à partir de là, la courbe décrit le retrait de la pointe au point -5-.avant de retrouver finalement sa position initiale (figure 13).

3.1.5.2. Le mode Quantitative Imaging (Qi)

Nous avons principalement utilisé le mode Quantitative Imaging QI^{TM} , développé par JPK et disponible sur l'AFM NanoWizard 3 que nous avons. Nos résultats présentés plus bas, ont été réalisés en milieu liquide et ont permis de vérifier que ce mode fonctionnait avec une minimisation importante des forces latérales générées par la pointe sur l'échantillon. Des courbes de force complètes peuvent être ainsi réalisées à chaque pixel de l'image, avec une grande résolution spatiale. Nous avons choisi de travailler avec une force verticale d'appui « pointe-échantillon » inférieure à 5nN pour des leviers de raideur voisine de quelques dixièmes de N/m. Les courbes sont obtenues à partir d'une vitesse constante de 50 à

500 $\mu\text{m/s}$, avec une extension totale de 500 nm, et avec un retrait supplémentaire de 100 nm (sur lequel les données ne sont pas enregistrées pour ne pas surcharger le disque dur de l'ordinateur) en passant d'un pixel à un autre.

En chaque point de la zone à étudier de l'échantillon, les courbes donnant la variation de la force en fonction de la distance échantillon/pointe lors de l'approche et du retrait sont enregistrées à une cadence rapide. Les mesures AFM conduites par ce mode QI permettent d'avoir accès à des informations pertinentes sur les propriétés mécaniques de l'échantillon étudié. Ainsi, la valeur de la rigidité de la paroi bactérienne peut en être déduite, ainsi que la valeur de la pression de turgescence. Cette dernière est obtenue grâce à la dérivée de la pente moyenne de la courbe de force, par l'équation numéro 13 des travaux de Yao et al., [55]. Ces travaux découlent d'autres travaux basé sur la déformation des enveloppes bactériennes par effet de tension de la pointe AFM [56], [57], dont la complexité a été considérablement réduite par Yao et al [55].

3.2. Application de l'AFM aux objets biologiques

La microscopie à force atomique, a été depuis sa découverte, adaptée à différents environnements (milieux sous vide, ambiants, ou plus récemment liquide...) et développée pour différentes applications en physique, en métrologie, en chimie ou encore en biologie.

Cependant, son application en milieu liquide dans le domaine de la biologie restait difficile face à de nombreuses difficultés expérimentales et verrous technologiques. Aujourd'hui, on assiste à une forte expansion des essais de l'application de la microscopie à force atomique au domaine biologique, identique à l'expansion de l'application de l'AFM aux matériaux dans les années 80.

Contrairement à la microscopie électronique (permettant d'aller à de très petites échelles dans l'exploration d'objets biologiques), la microscopie à force atomique (AFM) présente l'avantage de pouvoir travailler en milieu liquide, dans des conditions très proches de l'état physiologique des bactéries. L'AFM, permet de connaître non seulement la structure de la surface de l'échantillon étudié (topographie), mais aussi d'en savoir plus sur ses propriétés physiques locales (élasticité, charges de surface...). Dans ce domaine, les méthodes classiques type microscopie électronique, apportent une information importante certes, mais incomplète avec des inconvénients de taille, tels que la manipulation contraignante et invasive de l'objet biologique avant son observation (extraction, séchage, dessiccation, marquage...).

3.2.1. Objets biologiques observés par AFM

De nombreux objets biologiques d'intérêt ont été observés par AFM, dans ce qui est présenté ci-dessous on se limite aux observations réalisées sur les organismes procaryotes.

- **Macromolécules biologiques imagées par AFM :**

Protéines : Les protéines ont été imagées pour la première fois à l'air en 1988 puis en liquide en 1990, depuis, de nombreux travaux ont été réalisés avec succès pour la mesure de l'énergie de repliement par exemple [58] ou la masse protéique[59], ou encore l'observation directe de l'effet de changement des paramètres physicochimiques (Température, pH) sur leur structure . Une étude récente a permis de réaliser une cartographie nanométrique de la distribution des protéines d'adhésion de mycobactérie [60] montrant ainsi l'existence de domaines qui joueraient un rôle important dans l'adhésion, et donc dans le processus infectieux hôte-pathogène. L'ensemble de ces études soulignent l'énorme apport de l'AFM et son grand potentiel dans l'étude des protéines, l'un des exemples le plus impressionnant et la caractérisation des structures de biomolécules à très haute résolution spatiale (figure 14, [61]).

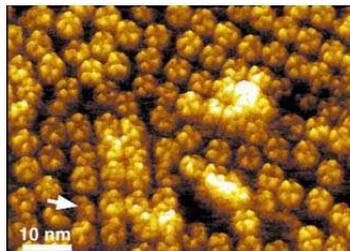


Figure 14 : Imagerie AFM de protéines MIP (Major intrinsic proteins) observées en milieu liquide. L'échelle verticale est codée en fausses couleurs (1,6nm) [61].

Ou encore l'imagerie de l'évolution rapide de la structure de la myosine au cours du temps (par AFM très haute vitesse (figure 15, [62]).

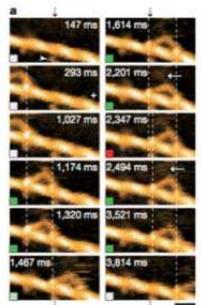


Figure 15 : Images successives du déplacement de molécules de myosine sur un filament d'actine par HS-AFM (High-Speed Atomic Force Microscopy) en milieu liquide : une image couvre une région de $130 \times 65 \text{ nm}^2$; deux image successives sont séparées de 146,7 ms [62].

Polysaccharides : il s'agit de la classe la plus abondante des biomolécules : c'est le composant majoritaire des organismes vivants (polysaccharides de réserve -glucose- et polysaccharides structuraux -cellulose-). Ils interviennent dans la protection des cellules, l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms [63]. Par manque d'outils adaptés, très peu d'informations sont connues sur ces molécules, leur organisation spatiale ou leurs propriétés (flexibilité, adhésion...). Les premières observations par AFM de polysaccharides (xanthane) ont été réalisées à l'air en mode contact [64], d'autres études ont été réalisées plus tard, en combinant l'AFM à la SMFS (Single Molecule Force Spectroscopy), permettant de mesurer différentes propriétés nanomécaniques et d'en déduire un certain nombre d'informations concernant la composition chimique ou la géométrie structurale [65], ou comparer un mutant de *Lactobacillus rhamnosus*, où le gène responsable de la production de polysaccharides de surface est délété, par rapport à une souche sauvage [63] ou encore de la pectine et caractériser son évolution pendant le ramollissement d'un fruit [66].

Lipo-polysaccharides (LPS) : c'est un composant essentiel de la membrane externe des bactéries Gram négatif (45 %), qui leur permet de résister aux agents extérieurs car il présente une perméabilité particulière lui permettant de jouer le rôle de barrière protectrice- (par exemple, les mutants sans LPS sont plus perméables aux agents mutagènes). Ce composant a été imagé par AFM chez *E.Coli* [67] avec une très grande résolution (latéralement 50 Å, verticalement 5 Å), une corrélation entre la longueur du LPS et l'adhésion bactérienne a été aussi établie [63].

Pili : Les pili ou « fimbriae » sont des appendices (terminaisons non flagellaires) se situant à la surface de la paroi bactérienne [68], généralement les bactéries Gram - et exceptionnellement chez quelques Gram+. Ces organelles sont plus fins et courts que les flagelles, et ont été observés pour la première fois dans les années 1950's par microscopie électronique. Ils interviennent dans la mobilité des bactéries et dans la pathogénicité (adhésion à la cellule infectée). Les mieux caractérisés sont (i) les pili de Type I (exprimés par *E.Coli*) ce sont des pili rigides, en forme de tige de 1-2µm de longueur, avec une extrémité flexible, ils sont impliqués dans les interactions bactéries-récepteurs de cellules hôtes durant le processus infectieux, (ii) les pili de Type IV (exprimés par *E.Coli*, *pseudomonas...*) ont la même longueur que les pili de type I mais sont plus flexibles et (iii) les « curli pili » avec une structure enroulée composée d'un seul type de sous unités « curline » (il s'agit d'un type différents des autres types de pili car synthétisé en absence de signal de clivage de peptide). Les pili de Type I et de type IV, les plus courants, adhèrent à la cellule hôte en induisant un signal dans ces cellules, (seul le type IV permet un transfert de matériel génétique). Ces pili

sont capables de se rétracter produisant une force motrice « twitching motility » (chez *P. aeruginosa* par exemple [69]). Tous ces pili forment une association initiale avec la cellule hôte, suivie par un attachement plus proche de cette dernière. Leur étude est primordiale dans la compréhension du fonctionnement de différentes bactéries (mobilité, formation de biofilms) ainsi que dans l'étude des processus infectieux qu'elles provoquent. Les pili de type IV chez *P. aeruginosa* (bactérie gram-négative) ont été imagés par AFM, après séchage, à l'air (en atmosphère gazeuse), les courbes de forces expérimentales correspondent aux valeurs retrouvées dans la littérature pour une large variété de biopolymères. Des pili ont aussi été imagés à l'air par AFM, chez *Lactococcus lactis* (bactérie gram-positif) (figure 16, [70]).

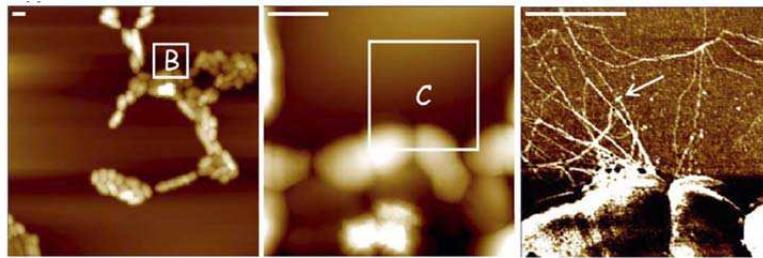


Figure 16 : Imagerie AFM à l'air de pili de la bactérie Gram+, *Lactococcus lactis* [70].

Concernant la constante de rigidité, il a été démontré que ce paramètre était indépendant de la longueur des pili [71]. D'autres travaux ont été menés sur des pili, en fonctionnalisant chimiquement des pointes AFM, afin de sonder l'hydrophobicité. Là aussi, les images AFM où on voit clairement des pili sont obtenues à l'air. L'imagerie en liquide est beaucoup plus délicate : ils sembleraient que les pili soient apparents à l'image uniquement en utilisant une pointe hydrophile (fonctionnalisée chimiquement). Cela laisse suggérer que ces pili sont hydrophobes et qu'en utilisant les pointes AFM hydrophobe, ces structures -pili- s'attachent à la pointe, ce qui rend impossible l'imagerie [72].

Flagelles : il s'agit d'organelles utilisées par les bactéries pour le mouvement dans le liquide, ils peuvent être distingués des pili par la différence de rigidité, de taille et de nombre. Les flagelles ont typiquement 10 μ m de longueur et 12-25 nm de diamètre (mesures par microscopie électronique [73]). Des tests menés par AFM, montrent qu'avec cette technique, il est simple, et précis de distinguer les pili des flagelles (flagelles 15-18 nm de diamètre / 4-6 nm pour les pili [71]), ces mesures ont été effectués à l'air et en mode contact. D'autres travaux ont été conduits à l'air montrant que l'orientation de ces flagelles jouait un rôle important dans les premières phases de la formation d'un biofilm chez *Pseudomonas fluorescens* (figure 17,[74]). Enfin les flagelles ont été imagés par AFM à l'air, en mode contact, à une haute résolution spatiale.

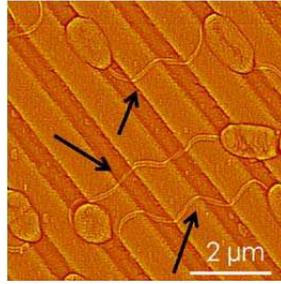


Figure 17 : Image AFM de flagelles de *P. fluorescens* durant la première phase formation d'un biofilm, les flèches montrent l'orientation des flagelles vers les cellules voisines [74].

Des essais pour imager ces flagelles en milieu liquide, ont été réalisés, mais sans succès. L'imagerie est décrite comme impossible à faire, ceci est expliqué par leur disparition pendant les étapes de préparations, ou leur interaction dans le liquide avec la pointe rendant impossible l'imagerie, d'autres travaux concluent à la même chose [75], [76].

Capsules bactériennes : Il s'agit d'une enveloppe qui entoure la paroi de certaines bactéries, (de nature polysidique ou protéique) et qui joue un rôle dans la résistance de ces bactéries (barrière à des substances toxiques) ainsi que leur virulence ou encore leur stockage de nutriments. L'exploration des capsules bactériennes, en utilisant l'AFM a été réalisée sur *Staphylococcus aureus*, après séchage à l'air, en mode tapping, et des différences topographiques entre les souches qui avaient des capsules et celles qui en étaient dépourvues (capsules-négatives) ont été mises en évidence [77]. L'étude des capsules a aussi été effectuée en milieu liquide avec immobilisation, révélant la présence de capsules chez toutes les bactéries étudiées (même celles qui étaient considérées comme n'ayant pas de capsules par d'autres types de microscopies) [78].

S-layers : la « couche S » ou « couche de surface », qui comme son nom l'indique, est une enveloppe de la cellule bactérienne. Son rôle est de protéger la cellule contre les fluctuations ioniques, les variations de pH, le stress osmotique, les enzymes ou les bactéries prédatrices. Elle contribue également à la virulence des agents pathogènes, d'où le fort intérêt que suscite son étude. Les premières observations de cette couche S sur une bactérie vivante, *Corynebacterium glutamicum*, ont été réalisées grâce à l'AFM [79], ouvrant de nouvelles perspectives dans l'exploration de ce type de molécules dans leurs environnements naturels [80].

Biofilms

Des observations de biofilms ont été réalisées par AFM (figure 18). Elles ont permis, entre autres, de mettre en évidence des structures de la taille de grosses protéines à la surface de *Pseudomonas putida* ainsi que des flagelles, emprisonnés dans le biofilm [81]. D'autres biofilms ont été imagés sur surfaces solides, à l'air ou en liquide, par AFM [82] et la structure d'un biofilm formé par *Lactococcus lactis* a été observée, elle se présente sous forme de réseau spongieux avec des petits creux (trous) [83], finalement l'évolution du biofilm a été explorée par AFM, au cours du temps [84].

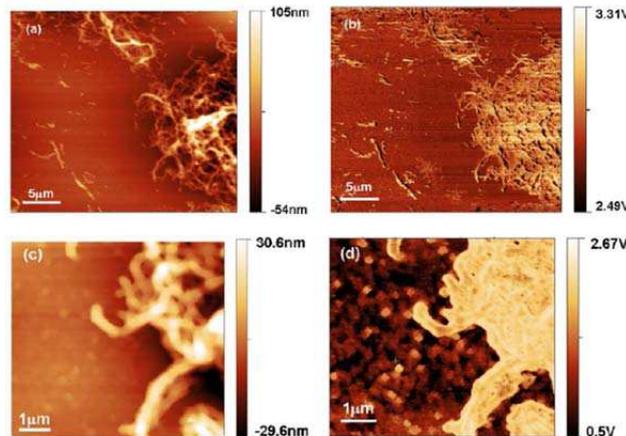


Figure 18 : Images AFM de topographie (a et c) et de phase (b et d) de la première couche d'un biofilm de *X. fastidiosa* sur lame de verre après 6-h de croissance en cellule liquide AFM. [84].

3.3. Immobilisation bactérienne pour imagerie AFM en milieu liquide

Ainsi, de grandes avancées ont été faites dans l'application de la microscopie à force atomique à différents objets biologiques. Pour l'ensemble de ces échantillons, l'observation à l'air était plus ou moins aisée ne nécessitant aucun protocole de préparation préalable. Par contre, l'observation d'un échantillon biologique par AFM en milieu liquide est considérée comme un grand challenge vu la difficulté d'imager ce genre de substrat, spécialement pour les bactéries. En effet, il s'agit de matière vivante, souple, qui peut être facilement déplacée par le mouvement de balayage (scan) de la pointe AFM pendant l'imagerie. En effet, les forces d'adhésions des bactéries sont plus faibles que les forces latérales d'interaction de la pointe AFM avec le substrat, d'où le détachement de la bactérie de ce dernier lors du scan AFM.

Dans l'ensemble des travaux cités ci-dessus, quand l'imagerie AFM se fait en liquide, un point commun existe entre les différents protocoles expérimentaux, celui de l'étape d'immobilisation, avant de passer à l'imagerie. Cette étape est unanimement décrite comme

indispensable et essentielle pour pouvoir obtenir des images satisfaisantes en liquide. Pour avoir des images AFM réussies, une immobilisation ferme a été donc présentée comme un prérequis indispensable et un challenge à relever.

Différentes méthodes ont été utilisées sur différentes sortes d'échantillons, avec plus ou moins de succès, de maîtrise et de reproductibilité.

- **Les méthodes d'immobilisation**

L'obstacle à l'imagerie résidait dans la faible surface de contact entre substrat et échantillon bactérien, ce qui induit le détachement de la bactérie par le mouvement de scan de la pointe AFM qui balaye la surface de l'échantillon [85]. D'immenses progrès ont été réalisés, dans le développement et l'amélioration des techniques d'immobilisation des cellules microbiennes.

Différentes méthodes ont été développées afin de les imager :

- le piégeage mécanique dans un support poreux, figure 19, (oxyde d'aluminium [86], film de titane / oxyde de titane [87] ou membrane à polycarbonate [88]), a été adapté à l'imagerie AFM. Cette méthode permet d'observer des cellules entières en milieu liquide, mais elle présente de nombreux inconvénients; en effet, elle ne s'applique que sur des cellules sphériques –coques-, l'information n'est pas obtenue sur l'ensemble de la bactérie et il est difficile de suivre des processus tels que la division cellulaire avec une telle immobilisation [89]. De plus les effets du confinement sur les cellules microbiennes étudiées sont mal connus et pourraient être importants.

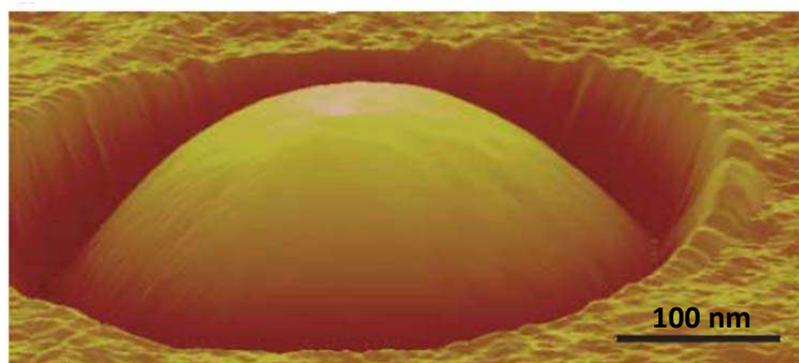


Figure 19 : Une image de hauteur (3D) obtenue par AFM en milieu liquide d'une cellule unique de levure *Saccharomyces cerevisiae*, immobilisée dans une membrane poreuse [90].

- La lithographie [89] est une méthode introduite afin d'immobiliser les bactéries par utilisation de motifs d'oxyde de silicium [91]. Elle est utilisée afin de « dessiner » des tableaux avec des « cases » (trous) que les bactéries vont occuper (où elles vont être

piégées). Cette méthode permet d'avoir un parfait contrôle de la taille, la forme, profondeur des cases (trous) (contrairement à la membrane poreuse de polycarbonate), par contre les bactéries restent toujours bloquées mécaniquement, et ne se comportent donc pas comme dans leur milieu naturel (déplacement, processus physiologiques, sécrétions...).

- La fixation chimique avec utilisation d'agents de réticulation (par exemple le glutaraldéhyde), il s'agit d'une méthode présentant de grands inconvénients, vu que les groupes actifs utilisés affectent la viabilité, et dénaturent l'échantillon traité, en contaminant les parois cellulaires [92], elle apporte donc des informations non représentatives de l'état naturel des bactéries étudiées[93].
- Immobilisation par reconnaissance spécifique grâce à une fonction biologique. Par exemple, une approche très intéressante [94] a consisté à utiliser des anticorps qui sont dirigés contre des antigènes spécifiques de la bactérie étudiée. Cependant, les résultats obtenus montrent que cette méthode est contraignante, du fait que l'antigène cible doit être en dehors de la membrane bactérienne et en même temps être bien attaché à cette dernière.
- l'adsorption sur support couvert d'agar (testée sur *Saccharomyces cerevisiae* [95]), ou prétraité à la poly-L-lysine [96], [97], au 3-aminopropyltriméthoxysilane [72] ou encore à l'agar ou à la gélatine [98]. Une forte immobilisation (attachement) de l'échantillon bactérien est réalisée grâce à cette technique sur une matrice souple et déformable. Cependant, il faut que cette couche soit assez fine pour que la cellule bactérienne imagée soit en dehors de cette dernière, de plus cette couche peut altérer la surface bactérienne et les structures externes et produire des artefacts sur les images AFM, sans oublier qu'elle peut être retenue sur la pointe, la salissant et diminuant considérablement la qualité des images.
- Une autre méthode proposée récemment consiste à immobiliser des cellules vivantes dans les motifs réalisés à partir de tampons microstructurés et fonctionnalisés en polydiméthylsiloxane (PDMS) en utilisant un mode de dépôt combinant la convection et la capillarité. [99]

Section 4 : Dérivés de l'AFM

Dès son apparition, l'AFM a tout d'abord été destiné aux matériaux, mais son utilisation a été par la suite étendue aux sciences biologiques comme décrit précédemment. A partir de ce moment, la microscopie à force atomique n'était plus seulement un outil d'imagerie, mais est devenue un outil extrêmement puissant et multifonctionnel de l'étude des composants de surface des cellules bactériennes.

Ainsi, l'AFM est un outil unique, du fait de la possibilité qu'il offre d'imager la topographie des surfaces bactériennes, mais aussi de mesurer des forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon, de fonctionnaliser les pointes (le concept de « lab-on-tip » se développe) et de manipuler les échantillons.

Il y a eu apparition de déclinaisons de l'AFM, tels que la **SCFS** (Single-Cell Force Spectroscopy), la **CFM** (Chemical Force Microscopy) et la **SMFS** (Single-Molecule Force Spectroscopy) [100].

- **SCFS** : cette méthode a permis de mesurer les forces d'adhésion ; par exemple, des expériences ont été menées sur *E.Coli*, où il a été démontré que l'adhésion de la bactérie augmentait avec l'hydrophobicité du substrat [101].
- **CFM** : grâce à cette méthode, il a été démontré qu'il y avait une diminution de l'hydrophobicité de surface suite à l'utilisation d'un antibiotique (isoniazide) par une action qui consiste à l'inhibition de l'acide mycolique [102], ce qui est un exemple très intéressant et concret de l'apport de l'AFM à l'étude du comportement de bactéries pour l'étude de pistes thérapeutiques.
- **SMFS** : il s'agit d'une méthode puissante d'investigation des forces associées à des molécules biologiques uniques et d'étude des activités enzymatiques.[103] .

Grâce à ces déclinaisons, il est devenu possible d'imager un échantillon biologique, dans son état physiologique et dans son environnement natif, avec en plus de l'imagerie et la topographie de surfaces microbiologiques, la possibilité d'apporter des informations sur leurs propriétés physicochimiques.

Les attentes des informations pouvant être obtenues grâce à cet outil, sont très grandes et concernent différents domaines. Par exemple, pour comprendre l'organisation des composants

extracellulaires et leur interaction avec différents milieux et conditions environnantes, ou encore pour étudier la reconnaissance moléculaire qui est le premier stade de l'infection bactérienne et du déclenchement des processus de réactions et défenses immunitaires. Les applications concernent donc un large éventail de domaines, la microbiologie, la biologie clinique, la biotechnologie, l'agroalimentaire, ou encore l'écologie, l'environnement et la géo microbiologie (interface organique-minéral).

4.1. Les différents dérivés des pointes AFM

Les pointes AFM disponibles dans le commerce, sont composées de silicium (ou nitrure de silicium) et manquaient de diversité pour étudier différents échantillons biologiques. Beaucoup de travaux se sont développés pour y remédier. D'où le développement de pointes fonctionnalisées ou ce qui est appelé « Lab-on-Tip ».

Différents travaux ont été menés dans ce sens, on peut en citer quelques-uns :

- Des molécules ont été attachées à la pointe AFM afin d'étudier ensuite les interactions avec l'échantillon biologique scanné par cette pointe [104], ou sonder l'hydrophobicité et les charges de surface de cellules bactériennes.
- Utilisation de nanotubes de carbone comme pointe AFM [105].
- Caractérisation des propriétés mécaniques locales à l'échelle nanométrique (propriétés nanomécaniques), de différents échantillons biologiques. Un exemple qui illustre bien cette application, est l'étude de perforations de la membrane de bactérie Gram-, *Salmonella*, dans son état natif, en utilisant une pointe AFM tranchante, suivi de tests de viabilité. Grâce à ces essais, un mécanisme clé de survie de cette bactérie d'autoréparation de la membrane (bicouche lipidique et peptidoglycane) a pu être décrit [106].
- Pointes électrochimiques AFM-SECM (Scanning ElectroChemical Microscopy).

4.2. Couplage de l'AFM à la microscopie électrochimique (SECM)

La SECM ou la microscopie électrochimique à balayage permet l'étude de la réactivité locale d'un substrat [107] . La sonde dans ce cas est une UME (Ultramicroélectrode), le milieu d'étude est toujours liquide.

Le couplage de l'AFM et du SECM nécessite l'utilisation de sondes compatibles avec ces deux types de microscopie, de taille nanométrique. La disponibilité de telles sondes couplées

a largement limité le développement de la microscopie AFM/SECM, qui n'existe aujourd'hui qu'au sein de quelques équipes de recherche au monde [108], [109].

Fabrication des sondes AFM-SECM

Les sondes AFM-SECM peuvent être divisées en deux catégories, les sondes « artisanales » fabriquées par des méthodes classiques relativement bien maîtrisées et les sondes « microfabriquées » très sophistiquées mais très peu disponibles vu la difficulté de la maîtrise de leur fabrication.

4.2.1. Les sondes AFM-SECM « artisanales »

Développées au sein de certaines équipes en réalisant une succession d'étapes. Tout d'abord la formation d'un bras flexible (à base de fil d'or), puis l'électrocorrosion de la pointe (en appliquant un potentiel suffisamment élevé pour provoquer la dissolution anodique du fil d'or), le préformage de la bille à l'extrémité de cette pointe AFM-SECM (« ballbonding»), l'isolation complète (par électrodéposition cathodique de peinture électrophorétique) et enfin l'exposition sélective de l'extrémité de la pointe. L'électrode ainsi obtenue présente à son extrémité, une bille électroactive de 800 nm de diamètre environ [110], [111].

4.2.2. Les sondes AFM-SECM « micro-fabriquées »

Ces sondes font appel à des techniques beaucoup plus pointues. Elles sont principalement fabriquées par FIB (Focused Ion Beam). L'une des équipes leader en cette matière et qui maîtrisent le mieux le dépôt par FIB, est celle de Mme Christine Kranz (Institut of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Université d'Ulm, Allemagne), (Figure 20, [112]).

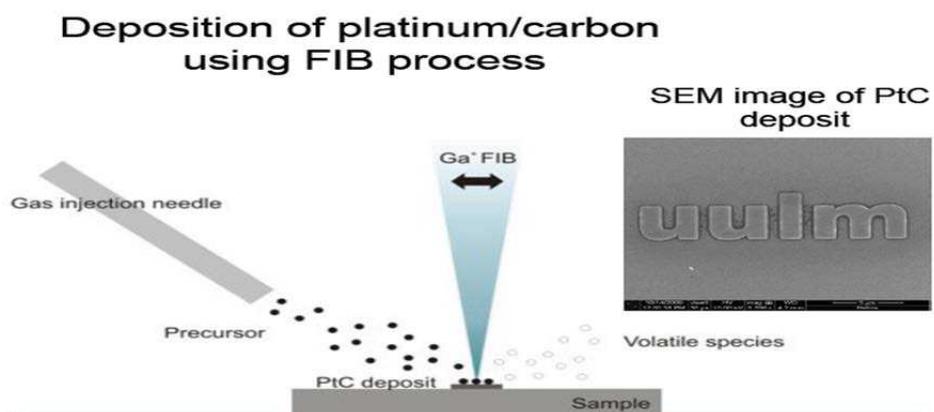


Figure 20 : Dépôt de platine par FIB (Focused Ion Beam) [112].

La fabrication de la pointe peut se faire de différentes manières, l'approche développée par cette équipe est de partir d'un levier AFM classique commercialisé (non conducteur), de déposer une couche électroactive, puis d'isoler le film métallique avec une couche chimiquement inerte et enfin supprimer partiellement la couche isolante en bout de pointe. Ainsi la zone conductrice est définie minutieusement sur le bout de la pointe uniquement (figure 21).

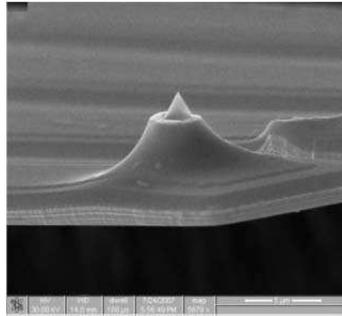


Figure 21 : Sonde AFM-SECM observée en MEB telle qu'elle a été réalisée par FIB (Focused Ion Beam) : la partie pointue est en platine et émerge d'une gaine isolante électriquement. [113]

Bilan de la littérature, nos objectifs

L'étude succincte de la littérature, qui vient d'être présentée, montre que l'étude par AFM ou par des méthodes dérivées (SECM, etc) d'objets biologiques vivants est délicate et nécessite souvent le passage par une étape incontournable d'immobilisation, par l'observateur, de ceux-ci sur le substrat. A défaut, l'échantillon biologique sera entraîné plus ou moins fortement par le balayage de la pointe AFM et les images obtenues perdront de leur résolution spatiale.

Notre objectif principal était donc de nous affranchir de cette étape artificielle en jouant sur les processus naturels mis en œuvre par les bactéries pour venir coloniser une surface. Notre rêve était alors de pouvoir étudier et comprendre les mécanismes de formation des biofilms dans leurs premières étapes (étapes ② et ③ de figure 1).

Nous avons aussi conscience que la réalisation de leviers SECM était complexe et nécessitait la maîtrise de techniques performantes non disponibles sur notre campus. Cependant, une solution de « secours » plus facilement atteignable pouvait s'offrir à nous : il s'agissait de travailler avec des sondes électriques de surfaces électriquement actives limitées au seul levier AFM. Ceci nous semblait aussi être digne d'intérêt puisque permettant de relier les échelles de longueur (micrométriques et en-deçà) caractéristiques du monde bactérien à celles des expériences de laboratoire en colonnes (décimétriques) ou celles des expériences de terrain (échelles métriques) de nos collègues du projet ANR « BIOPHY ».

Références bibliographiques

1. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86–95.
2. Tomczyk-Żak K, Kaczanowski S, Drewniak L, Dmoch L, Sklodowska A, et al. (2013) Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *Sci Total Environ* 461-462C: 330–340. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.087.
3. Zobell CE, Allen EC (1933) Attachment of Marine Bacteria to Submerged Slides. *Exp Biol Med* 30: 1409–1411. doi:10.3181/00379727-30-6954.
4. Tarjányi-Szikora S, Oláh J, Makó M, Palkó G, Barkács K, et al. (2013) Comparison of different granular solids as biofilm carriers. *Microchem J* 107: 101–107. doi:10.1016/j.microc.2012.05.027.
5. Jenal U (2013) Think globally, act locally: How bacteria integrate local decisions with their global cellular programme. *EMBO J advance online publication*. Available: <http://www.nature.com/emboj/journal/vaop/ncurrent/full/emboj2013140a.html>. Accessed 2 July 2013.
6. Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E, Hengge R (2013) The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J advance online publication*. Available: <http://www.nature.com/emboj/journal/vaop/ncurrent/full/emboj2013120a.html>. Accessed 2 July 2013.
7. Nagant C, Tré-Hardy M, Devleeschouwer M, Dehaye JP (2010) Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *J Microbiol Methods* 82: 243–248. doi:10.1016/j.mimet.2010.06.011.
8. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI (1999) *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De Boeck Supérieur. 994 p.
9. Monds RD, O'Toole GA (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 17: 73–87. doi:10.1016/j.tim.2008.11.001.
10. Jung J-H, Choi N-Y, Lee S-Y (2013) Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiol* 34: 70–80. doi:10.1016/j.fm.2012.11.008.
11. Cuadrado-Silva CT, Castellanos L, Arévalo-Ferro C, Osorno OE (2013) Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochem Syst Ecol* 46: 101–107. doi:10.1016/j.bse.2012.09.010.
12. Bouillaut L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, et al. (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* 36: 3791–3801. doi:10.1093/nar/gkn149.
13. Popat R, Crusz SA, Messina M, Williams P, West SA, et al. (2012) Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms. *Proc R Soc B Biol Sci* 279: 4765–4771. doi:10.1098/rspb.2012.1976.
14. Dubey GP, Ben-Yehuda S (2011) Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell* 144: 590–600. doi:10.1016/j.cell.2011.01.015.

15. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
16. Brooun A, Liu S, Lewis K (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 640–646.
17. Persistent infections and immunity in cystic fi... [Front Biosci. 2002] - PubMed - NCBI (n.d.). Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815305>. Accessed 3 July 2013.
18. Srey S, Jahid IK, Ha S-D (2013) Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31: 572–585. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001.
19. Li M, Nakhla G, Zhu J (2012) Simultaneous carbon and nitrogen removal with enhanced bioparticle circulation in a Circulating Fluidized Bed Biofilm Reactor. *Chem Eng J* 181–182: 35–44. doi:10.1016/j.cej.2011.12.073.
20. Sieniutycz S, Jezowski J (2013) 10 - Fuel cells and limiting performance of electrochemobiological systems. *Energy Optimization in Process Systems and Fuel Cells (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier. pp. 373–428. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080982212000102>. Accessed 15 July 2013.
21. Mages M, Ovári M, von Tümpling W Jr, Kröpfl K (2004) Biofilms as bio-indicator for polluted waters? Total reflection X-ray fluorescence analysis of biofilms of the Tisza river (Hungary). *Anal Bioanal Chem* 378: 1095–1101. doi:10.1007/s00216-003-2291-5.
22. ADEME / Ernst & Young (2010) [rapport_taux_couts_traitements_sols_eaux-3.pdf](#).
23. Fang J, Zhang L, Bazylnski DA (2010) Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends Microbiol* 18: 413–422. doi:10.1016/j.tim.2010.06.006.
24. Cox MM, Battista JR (2005) *Deinococcus radiodurans* — the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3: 882–892. doi:10.1038/nrmicro1264.
25. U.S. Environmental Protection Agency O of UST (2007) [OUST_FY07_Annual_Report-_Final_4-08.pdf](#). www.epa.gov/oust. Available: http://www.epa.gov/OUST/pubs/OUST_FY07_Annual_Report-_Final_4-08.pdf. Accessed 3 July 2013.
26. Lechner U, Brodkorb D, Geyer R, Hause G, Härtig C, et al. (2007) *Aquicola tertiarycarbonis* gen. nov., sp. nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1295–1303. doi:10.1099/ijs.0.64663-0.
27. Hernandez-Perez G, Fayolle F, Vandecasteele J-P (2001) Biodegradation of ethyl t -butyl ether (ETBE), methyl t -butyl ether (MTBE) and t -amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 117–121. doi:10.1007/s002530000482.
28. Francois A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, et al. (2002) Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl Environ Microbiol* 68: 2754–2762. doi:10.1128/AEM.68.6.2754-2762.2002.

29. Malandain C, Fayolle-Guichard F, Vogel TM (2010) Cytochromes P450-mediated degradation of fuel oxygenates by environmental isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 72: 289–296. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00847.x.
30. Auffret M, Labbé D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F (2009) Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl Environ Microbiol* 75: 7774–7782. doi:10.1128/AEM.01117-09.
31. BACTERIA CAPABLE OF DEGRADING MULTIPLE PETROLEUM COMPOUNDS IN SOLUTION IN AQUEOUS EFFLUENTS AND PROCESS FOR TREATING SAID EFFLUENTS - IFP ENERGIES NOUVELLES (n.d.). Available: <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Bacteria-capable-degrading-multiple-petroleum/WO2010112696.html>. Accessed 3 July 2013.
32. Nyquist JE, Carr BJ, Davis RK (1998) Dc Resistivity Monitoring Of Potassium Permanganate Injected To Oxidize Tce In Situ. Available: <http://www.earthdoc.org/publication/publicationdetails/?publication=46725>. Accessed 3 July 2013.
33. Vichabian Y, Morgan FD (2002) Self potentials in cave detection. *Lead Edge* 21: 866–871.
34. wri_annualreport_2006.pdf (n.d.). Available: http://pdf.wri.org/wri_annualreport_2006.pdf. Accessed 3 July 2013.
35. Sauck WA (2000) A model for the resistivity structure of LNAPL plumes and their environs in sandy sediments. *J Appl Geophys* 44: 151–165. doi:10.1016/S0926-9851(99)00021-X.
36. Atekwana EA, Slater LD (2009) Biogeophysics: A new frontier in Earth science research. *Rev Geophys* 47: RG4004.
37. Abdel Aal GZ, Atekwana EA, Atekwana EA (2010) Effect of bioclogging in porous media on complex conductivity signatures. *J Geophys Res Biogeosciences* 115: n/a–n/a. doi:10.1029/2009JG001159.
38. Revil A, Atekwana E, Zhang C, Jardani A, Smith S (2012) A new model for the spectral induced polarization signature of bacterial growth in porous media. *Water Resour Res* 48: n/a–n/a. doi:10.1029/2012WR011965.
39. Sivenas P, Beales FW (1982) Natural geobatteries associated with sulphide ore deposits, II. Field studies at the viburnum trend, southeast Missouri, U.S.A. *J Geochem Explor* 17: 145–160. doi:10.1016/0375-6742(82)90030-9.
40. Naudet V, Revil A (2005) A sandbox experiment to investigate bacteria-mediated redox processes on self-potential signals. *Geophys Res Lett* 32: n/a–n/a. doi:10.1029/2005GL022735.
41. Ntarlagiannis D, Williams KH, Slater L, Hubbard S (2005) Low-frequency electrical response to microbial induced sulfide precipitation. *J Geophys Res* 110. Available: <http://doi.wiley.com/10.1029/2005JG000024>. Accessed 4 July 2013.
42. Ntarlagiannis D, Atekwana EA, Hill EA, Gorby Y (2007) Microbial nanowires: Is the subsurface “hardwired”? *Geophys Res Lett* 34: n/a–n/a. doi:10.1029/2007GL030426.

43. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, et al. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435: 1098–1101. doi:10.1038/nature03661.
44. Ball P (2007) Bacteria may be wiring up the soil. *Nature* 449: 388–388. doi:10.1038/449388a.
45. Arora T, Linde N, Revil A, Castermant J (2007) Non-intrusive characterization of the redox potential of landfill leachate plumes from self-potential data. *J Contam Hydrol* 92: 274–292. doi:10.1016/j.jconhyd.2007.01.018.
46. Jouniaux L, Maineult A, Naudet V, Pessel M, Sailhac P (2009) Review of self-potential methods in hydrogeophysics. *Comptes Rendus Geosci* 341: 928–936. doi:10.1016/j.crte.2009.08.008.
47. Albrecht R, Gourry JC, Simonnot M-O, Leyval C (2011) Complex conductivity response to microbial growth and biofilm formation on phenanthrene spiked medium. *J Appl Geophys* 75: 558–564. doi:10.1016/j.jappgeo.2011.09.001.
48. Chernyh NA, Gavrilov SN, Sorokin VV, German KE, Sergeant C, et al. (2007) Characterization of technetium(VII) reduction by cell suspensions of thermophilic bacteria and archaea. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 467–472. doi:10.1007/s00253-007-1034-5.
49. Young R, Ward J, Scire F (1972) The Topografiner: An Instrument for Measuring Surface Microtopography. *Rev Sci Instrum* 43: 999–1011. doi:doi:10.1063/1.1685846.
50. Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 56: 930–933. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930.
51. Martin Y, Williams CC, Wickramasinghe HK (1987) Atomic force microscope—force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J Appl Phys* 61: 4723–4729. doi:doi:10.1063/1.338807.
52. McClelland GM, Erlandsson R, Chiang S (1987) Atomic Force Microscopy: General Principles and a New Implementation. In: Thompson DO, Chimenti DE, editors. *Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation*. Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation. Springer US. pp. 1307–1314. Available: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-1893-4_148. Accessed 4 July 2013.
53. Israelachvili JN (1997) *Intermolecular and surface forces*. London [u.a.]: Acad. Press.
54. Kranz C (2011) *Principles of AFM and Microfabrication Techniques*, SECM Summer School, EPFL (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne), Lausanne, Suisse.
55. Yao X, Walter J, Burke S, Stewart S, Jericho MH, et al. (2002) Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces* 23: 213–230. doi:10.1016/S0927-7765(01)00249-1.
56. Boulbitch AA (1998) Deflection of a cell membrane under application of a local force. *Phys Rev E* 57: 2123.
57. Arnoldi M, Fritz M, Bäuerlein E, Radmacher M, Sackmann E, et al. (2000) Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Top* 62: 1034–1044.

58. Thomson NH, Fritz M, Radmacher M, Cleveland JP, Schmidt CF, et al. (1996) Protein tracking and detection of protein motion using atomic force microscopy. *Biophys J* 70: 2421–2431. doi:10.1016/S0006-3495(96)79812-0.
59. Fuentes-Perez ME, Dillingham MS, Moreno-Herrero F (2013) AFM volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids. *Methods San Diego Calif* 60: 113–121. doi:10.1016/j.ymeth.2013.02.005.
60. Dupres V, Menozzi FD, Loch C, Clare BH, Abbott NL, et al. (2005) Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat Methods* 2: 515–520. doi:10.1038/nmeth769.
61. Engel A, Müller DJ (2000) Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Mol Biol* 7: 715–718. doi:10.1038/78929.
62. Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468: 72–76. doi:10.1038/nature09450.
63. Francius G, Lebeer S, Alsteens D, Wildling L, Gruber HJ, et al. (2008) Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACS Nano* 2: 1921–1929. doi:10.1021/nn800341b.
64. Meyer A, Rouquet G, Lecourtier J, Toulhoat H (1992) Characterization by atomic-force microscopy of xanthan in interaction with mica. Editions TECHNIP. 400 p.
65. Sletmoen M, Maurstad G, Sikorski P, Paulsen BS, Stokke BT (2003) Characterisation of bacterial polysaccharides: steps towards single-molecular studies. *Carbohydr Res* 338: 2459–2475.
66. Posé S, Kirby AR, Mercado JA, Morris VJ, Quesada MA (2012) Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydr Polym* 88: 882–890. doi:10.1016/j.carbpol.2012.01.029.
67. Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, Bulychev A, Mobashery S, et al. (2000) High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the Escherichia coli Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* 16: 2789–2796. doi:10.1021/la991013x.
68. Brinton CC (1959) Non-Flagellar Appendages of Bacteria. *Nature* 183: 782–786. doi:10.1038/183782a0.
69. Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G (2006) Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4: 509–519. doi:10.1038/nrmicro1443.
70. Oxaran V, Ledue-Clier F, Dieye Y, Herry J-M, Péchoux C, et al. (2012) Pilus Biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 7: e50989. doi:10.1371/journal.pone.0050989.
71. Touhami A, Jericho MH, Boyd JM, Beveridge TJ (2006) Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 188: 370–377. doi:10.1128/JB.188.2.370-377.2006.
72. Dorobantu LS, Bhattacharjee S, Foght JM, Gray MR (2008) Atomic Force Microscopy Measurement of Heterogeneity in Bacterial Surface Hydrophobicity. *Langmuir* 24: 4944–4951. doi:10.1021/la7035295.

73. Neidhardt FC (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
74. Díaz C, Schilardi P, Salvarezza R, Fernández Lorenzo de Mele M (2011) Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 82: 536–542.
75. Greif D, Wesner D, Regtmeier J, Anselmetti D (2010) High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy* 110: 1290–1296. doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.004.
76. Louise Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, et al. (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 110: 1349–1357.
77. Tollersrud T, Berge T, Andersen SR, Lund A (2001) Imaging the surface of *Staphylococcus aureus* by atomic force microscopy. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 109: 541–545.
78. Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ, Dutcher JR (2008) Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Appl Environ Microbiol* 74: 5457–5465. doi:10.1128/AEM.02075-07.
79. Dupres V, Alsteens D, Pauwels K, Dufrêne YF (2009) In vivo imaging of S-layer nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir ACS J Surfaces Colloids* 25: 9653–9655. doi:10.1021/la902238q.
80. Tang J, Ebner A, Kraxberger B, Leitner M, Hykollari A, et al. (2009) Detection of metal binding sites on functional S-layer nanoarrays using single molecule force spectroscopy. *J Struct Biol* 168: 217–222. doi:10.1016/j.jsb.2009.02.003.
81. Gunning P a., Kirby A r., Parker M l., Gunning A p., Morris V j. (1996) Comparative imaging of *Pseudomonas putida* bacterial biofilms by scanning electron microscopy and both DC contact and AC non-contact atomic force microscopy. *J Appl Microbiol* 81: 276–282. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb04329.x.
82. Steele A, Goddard DT, Beech IB (1994) An atomic force microscopy study of the biodeterioration of stainless steel in the presence of bacterial biofilms. *Int Biodeterior Biodegrad* 34: 35–46. doi:10.1016/0964-8305(94)90018-3.
83. Boonaert CJ, Rouxhet PG (2000) Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl Environ Microbiol* 66: 2548–2554.
84. Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, et al. (2011) The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* 359: 289–295. doi:10.1016/j.jcis.2011.03.066.
85. Dufrêne YF (2004) Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat Rev Microbiol* 2: 451–460.
86. Kasas S, Ikai A (1995) A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophys J* 68: 1678–1680.
87. Ivanova EP, Truong VK, Wang JY, Berndt CC, Jones RT, et al. (2010) Impact of Nanoscale Roughness of Titanium Thin Film Surfaces on Bacterial Retention. *Langmuir* 26: 1973–1982. doi:10.1021/la902623c.

88. Dufrêne Y. (2001) Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32: 153–165. doi:10.1016/S0968-4328(99)00106-7.
89. Kailas L, Ratcliffe EC, Hayhurst EJ, Walker MG, Foster SJ, et al. (2009) Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes. *Ultramicroscopy* 109: 775–780. doi:10.1016/j.ultramic.2009.01.012.
90. Ahimou F, Touhami A, Dufrêne YF (2003) Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. *Yeast Chichester Engl* 20: 25–30. doi:10.1002/yea.923.
91. Beringer J, Dugan L, Wu L, Hill H, Christian A, et al. (2009) Chemical tethering of motile bacteria to silicon surfaces. *BioTechniques* 46: 209–216. doi:10.2144/000113073.
92. Wang H, Bash R, Yodh JG, Hager GL, Lohr D, et al. (2002) Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin. *Biophys J* 83: 3619–3625.
93. Dague E, Gilbert Y, Verbelen C, Andre G, Alsteens D, et al. (2007) Towards a nanoscale view of fungal surfaces. *Yeast Chichester Engl* 24: 229–237. doi:10.1002/yea.1445.
94. Suo Z, Yang X, Avci R, Deliorman M, Rugheimer P, et al. (2009) Antibody Selection for Immobilizing Living Bacteria. *Anal Chem* 81: 7571–7578. doi:10.1021/ac9014484.
95. Gad M, Ikai A (1995) Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. *Biophys J* 69: 2226–2233. doi:10.1016/S0006-3495(95)80147-5.
96. Schaer-Zammaretti P, Ubbink J (2003) Imaging of lactic acid bacteria with AFM--elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 97: 199–208. doi:10.1016/S0304-3991(03)00044-5.
97. Colville K, Tompkins N, Rutenberg AD, Jericho MH (2010) Effects of Poly-lysine Substrates on Attached Escherichia coli Bacteria. *Langmuir* 26: 2639–2644. doi:10.1021/la902826n.
98. Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, et al. (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97: 209–216. doi:10.1016/S0304-3991(03)00045-7.
99. Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, et al. (2011) Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology* 22: 395102.
100. Dorobantu LS, Gray MR (2010) Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning* 32: 74–96. doi:10.1002/sca.20177.
101. Kang S, Elimelech M (2009) Bioinspired Single Bacterial Cell Force Spectroscopy. *Langmuir* 25: 9656–9659. doi:10.1021/la902247w.
102. Dague E, Alsteens D, Latgé J-P, Verbelen C, Raze D, et al. (2007) Chemical Force Microscopy of Single Live Cells. *Nano Lett* 7: 3026–3030. doi:10.1021/nl071476k.
103. Neuman KC, Nagy A (2008) Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 5: 491–505. doi:10.1038/nmeth.1218.

104. Ducker WA, Senden TJ, Pashley RM (1991) Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature* 353: 239–241. doi:10.1038/353239a0.
105. Wong SS, Joselevich E, Woolley AT, Cheung CL, Lieber CM (1998) Covalently functionalized nanotubes as nanometre- sized probes in chemistry and biology. *Nature* 394: 52–55. doi:10.1038/27873.
106. Suo Z, Avci R, Deliorman M, Yang X, Pascual DW (2009) Bacteria survive multiple puncturings of their cell walls. *Langmuir ACS J Surfaces Colloids* 25: 4588–4594. doi:10.1021/la8033319.
107. Bard AJ, Mirkin MV (2012) *Scanning Electrochemical Microscopy*. CRC Press. 673 p.
108. Gullo MR, Frederix PLTM, Akiyama T, Engel A, Nico F. deRooij, et al. (2006) Characterization of microfabricated probes for combined atomic force and high-resolution scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 78: 5436–5442.
109. Kranz C, Kueng A, Lugstein A, Bertagnolli E, Mizaikoff B (2004) Mapping of enzyme activity by detection of enzymatic products during AFM imaging with integrated SECM–AFM probes. *Ultramicroscopy* 100: 127–134. doi:10.1016/j.ultramic.2003.10.004.
110. Macpherson JV, Unwin PR (2001) Noncontact Electrochemical Imaging with Combined Scanning Electrochemical Atomic Force Microscopy. *Anal Chem* 73: 550–557. doi:10.1021/ac001072b.
111. Goyer C (2009) Développement d’une microscopie électrochimique à médiateur lié à la sonde en vue de son application à l’étude du fonctionnement d’une molécule d’enzyme unique Université Joseph Fourier. Available: http://hal-univ-diderot.archives-ouvertes.fr/docs/00/35/06/66/PDF/These_GOYER_Cedric.pdf. Accessed 4 July 2013.
112. Wiedemair J, Moon JS, Reinauer F, Mizaikoff B, Kranz C (2010) Ion beam induced deposition of platinum carbon composite electrodes for combined atomic force microscopy-scanning electrochemical microscopy. *Electrochem Commun* 12: 989–991.
113. Kranz C, Friedbacher G, Mizaikoff B, Lugstein A, Smoliner J, et al. (2001) Integrating an Ultramicroelectrode in an AFM Cantilever: Combined Technology for Enhanced Information. *Anal Chem* 73: 2491–2500. doi:10.1021/ac001099v.

| | |
|--|-----------|
| MATERIEL ET METHODES | 50 |
| SECTION 1 : IMAGERIE AFM NANOSCOPE III | 52 |
| 1.1. Pointes AFM utilisées | 52 |
| 1.2. Matériel biologique..... | 53 |
| 1.3. Culture bactérienne..... | 54 |
| 1.4. Imagerie AFM à l'air..... | 54 |
| 1.5. Imagerie AFM en milieu liquide | 55 |
| 1.5.1. Difficultés d'imagerie en milieu liquide | 55 |
| 1.5.2. Imagerie AFM en milieu liquide avec immobilisation..... | 56 |
| SECTION 2 : MISE EN PLACE DU NANOWIZARD 3..... | 59 |
| 2.1. Installation Nanowizard 3 et mode QI (Quantitative Imaging) | 59 |
| 2.1.1. Le Nanowizard 3 et ses composantes | 59 |
| 2.1.2. Mode QI (Quantitative Imaging) et conditions d'imagerie..... | 60 |
| 2.2. Matériel biologique et bactéries utilisées sur Nanowizard 3..... | 63 |
| 2.2.1. <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> | 63 |
| 2.2.2. <i>Lacotococcus lactis</i> | 65 |
| 2.2.3. <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Cab) et <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH) | 67 |
| SECTION 3 : COUPLAGE AFM SYSTEME OPTIQUE | 68 |
| 3.1. Couplage AFM-suivi optique | 68 |
| 3.2. Traitement des images optiques et AFM..... | 70 |
| 3.2.1. Traitement des images optiques et AFM pour suivi de déplacement de cyanobactéries | 70 |
| 3.2.2. Traitement des images optiques pour suivi de la croissance bactérienne (DO) | 71 |
| SECTION 4 : MESURES ELECTRIQUES | 72 |
| 4.1. Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam)..... | 72 |
| 4.1.1. Principe de la sonde ionique focalisée (FIB :Focused Ion Beam)..... | 73 |
| 4.1.2. Essais réalisation leviers AFM-SECM..... | 74 |
| 4.2. Mesures AFM en mode électrique avec leviers/électrodes de taille micrométrique : une première approche de l'AFM-EC | 75 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 81 |

Matériel et méthodes

Le présent travail a été lancé dans le cadre d'une démarche globale, celle de la création d'un axe « nano-bio-géophysique » au sein de notre équipe de recherche. Et il est partie prenante d'un programme de recherche ANR traitant des outils de surveillance d'une biodépollution, avec une tâche particulière, celle de l'étude des propriétés électriques des bactéries à l'échelle microscopique. La compréhension des phénomènes biologiques et physico-chimiques locaux et leur signature sur les signaux électrochimiques, a été menée jusqu'ici, soit à une échelle très grande par rapport à l'échelle où ces phénomènes se produisent (résultats moyennés sur un grand volume, donc imprécis), soit par des outils inadaptés à l'étude de phénomènes pilotés par des organismes vivants (échantillon bactérien soumis à des traitements agressifs, résultats obtenus biaisés puisque souvent obtenus à partir de bactéries mortes ou dans des conditions très éloignées de leur état physiologique naturel).

La méthodologie retenue dans le cadre de notre travail repose principalement sur une technique expérimentale innovante, aux performances adaptées à nos objectifs, mais encore insuffisamment utilisée, à cause de la difficulté de sa mise en œuvre. Elle consiste en une utilisation combinée des techniques (i) de microscopie à sonde locale, la microscopie à force atomique (AFM), permettant d'explorer des microorganismes à de très petites échelles tout en les préservant dans un état proche de leur état physiologique naturel en milieu liquide, et (ii) de microscopie électrochimique (SECM) afin d'obtenir, indépendamment, des informations sur la topographie de l'échantillon et sur les processus électrochimiques à l'échelle des bactéries (transferts d'électrons, de protons et de molécules) (Figure 22).

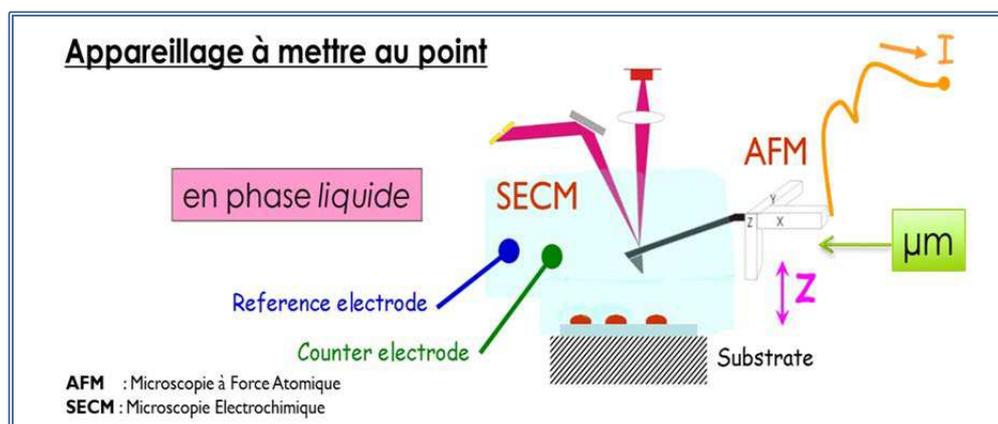


Figure 22 : Combinaison de la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie électrochimique (SECM).

L'un des plus grands obstacles à surmonter pour arriver à cette fin, est de pouvoir imager des objets biologiques, en particulier des bactéries, par AFM en milieu liquide tout en les maintenant dans leur état physiologique naturel. Aussi, un deuxième obstacle consiste à pouvoir effectuer des mesures électriques à cette petite échelle.

Section 1 : Imagerie AFM Nanoscope III

Concernant le premier point, à savoir l'imagerie AFM en milieu liquide, la difficulté réside dans le fait que la pointe parcourt la surface de l'échantillon et peut donc déplacer l'objet biologique qui y a été déposé si l'objet adhère mal sur le substrat. En effet, les forces d'adhésions des bactéries sont plus faibles que les forces latérales d'interactions de la pointe AFM avec le substrat, d'où le détachement de la bactérie de ce dernier lors du scan AFM.

En l'attente d'un montage dédié à nos expériences et afin de mettre au point ce futur dispositif expérimental, nous avons utilisé les installations du Laboratoire de Microscopie à Champ Proche, LMCP (en collaboration avec Dr. Michel Ramonda) de la CTM (Centrale de Technologie en Micro et nanoélectronique) de l'Université Montpellier 2. J'ai alors été amenée à travailler sur les microscopes AFM Nanoscope III et Dimension3100 de Bruker (figure 23) pour me familiariser avec la technique et mettre au point les protocoles expérimentaux.

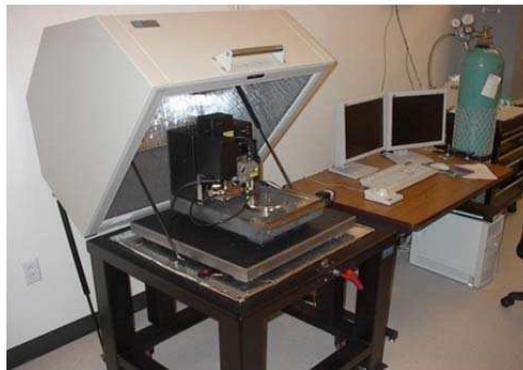


Figure 23 : Microscope à force atomique AFM Dimension 3100, Bruker.

1.1. Pointes AFM utilisées

Différentes pointes AFM ont été utilisées durant les expérimentations, les plus utilisées sont

- La pointe « PPP-EFM » (PontProbe Plus Electrostatic Force Microscopy- figure 24), le levier portant cette pointe présente une épaisseur de 3 μm , largeur 28 μm , longueur 225 μm , avec une constante de raideur de 2.8 N/m et une fréquence de résonance de 75 kHz.

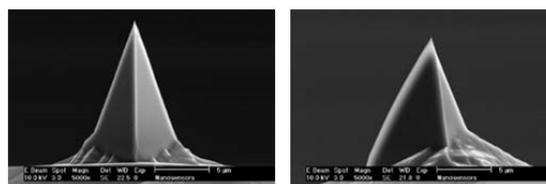


Figure 24 : Une pointe « PPP-EFM ». Hauteur de la pointe : $\sim 15\mu\text{m}$

- La pointe « Cont-Pt » (Contact Mode Pt/Ir coated -figure 25), le levier portant cette pointe présente une épaisseur de 2 μm , largeur 50 μm , longueur 450 μm , constante de raideur 0.2 N/m et une fréquence de résonance de 15 kHz, de « Nanosensors ».

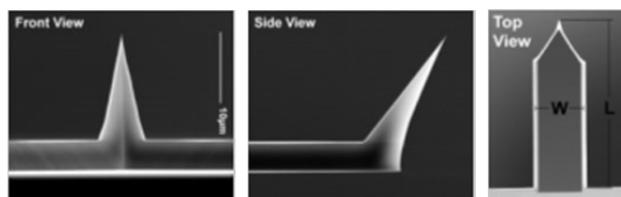


Figure 25 : Une pointe « Cont-pt » (Contact Mode Pt/Ir coated), « Nanosensors ».

- La pointe « PPP-FM » (PointProbePlus Force modulation Mode-figure 26), le levier portant cette pointe présente une épaisseur de 3 μm , largeur moyenne 30 μm , longueur 225 μm , constante de raideur 2.8 N/m et une fréquence de résonance de 75 kHz, de « Nanosensors ».

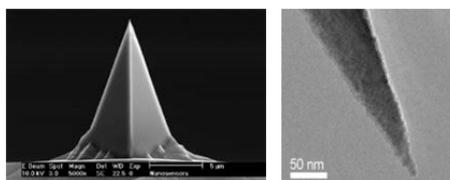


Figure 26 : Une pointe « PPP-FM » (PointProbePlus Force modulation Mode), « Nanosensors ».

- La pointe « PPP-NCH » (PointProbe Plus Non-Contact / Tapping Mode High Resonance Frequency-figure 27), le levier portant cette pointe présente une épaisseur 4 μm , largeur moyenne 30 μm , longueur 125 μm , constante de raideur 42 N/m et une fréquence de résonance de 330 kHz, « Nanosensors ».

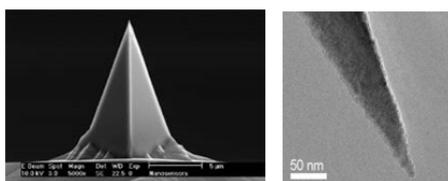


Figure 27: Une pointe « PPP-NCH » (PointProbe Plus Non-Contact/Tapping Mode High Resonance Frequency, « Nanosensors »).

1.2. Matériel biologique

Pour des raisons d'ordre pratique, de disponibilité et de maximisation de l'adhérence de la bactérie sur la surface ; la mise en place de ce dispositif expérimental, a été réalisée avec comme échantillon bactérien modèle, les cyanobactéries, souche *Anabaenopsis circularis* PCC 6720. Ces bactéries ont été acquises auprès de l'Institut Pasteur (Institut Pasteur Collection, CIP, Paris, France). Il s'agit d'un organisme procaryote mixotrophe, appartenant à la famille des *Nostocaceae*, du genre *Anabaenopsis*, mobile et à Gram négatif.

1.3. Culture bactérienne

Les cyanobactéries ont été cultivées dans le milieu BG 11 (NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, acide citrique, citrate ferrico-ammonique, EDTA, Na_2CO_3 et une solution d'oligoéléments). Ce milieu acquis auprès de SIGMA (« Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution, 50x, liquid »), est dilué à raison de 20 mL par 1L d'eau ultra pure (Milli Q water purification system, EMD Millipore corporation, USA), le milieu est ensuite stérilisé par voie humide (stérilisation à la vapeur d'eau sous pression) en l'autoclavant à 120 °C pendant 20 minutes. L'inoculation de cyanobactéries se fait à raison de 2 mL prélevés de la culture mère placés dans 50 mL de milieu BG 11. Le lancement des cultures bactériennes est conduit de façon stérile sous une hotte à flux laminaire. Les cultures sont placées dans une chambre de culture à une température de 25 °C à flux d'air constant, équipée d'un filtre anticontamination de l'air extérieur, avec un éclairage réglé selon une photopériode de 16 h/8 h éclairage/obscurité (lumière blanche de qualité Cool White, tubes fluorescents OSRAM 18 W) de $15 \pm 3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPF (Photosynthetic Photon Flux). Le repiquage a été réalisé une fois par mois (figure 28).



Figure 28 : Culture de cyanobactéries *Anabaenopsis circularis* PCC 6720.

1.4. Imagerie AFM à l'air

Tout d'abord, l'imagerie AFM des cyanobactéries a été réalisée en atmosphère gazeuse (air ambiant) pour voir comment se comportait l'échantillon et quelles étaient les difficultés rencontrées.

L'échantillon a été préparé sur lame de verre, préalablement nettoyée à l'alcool (pour les besoins de quelques manipulations, un nettoyage plus poussé a été réalisé en nettoyant la lame de verre avec du coton trempé dans un détergent basique, RBS 25, puis dans le carbonate de calcium, la lame est ensuite rincée à l'aide d'eau distillée puis de l'eau ultrapure). Un dépôt de 100 μL de culture de cyanobactéries est placé sur cette lame, puis séché à l'air ambiant

(jusqu'à évaporation quasi complète du liquide contenu, en moyenne 2 heures), ensuite l'échantillon est placé sur le porte échantillon de l'AFM afin d'être imagé. Une caméra optique, couplée à l'AFM, permet de localiser visuellement les bactéries à la surface de l'échantillon et de contrôler la position de la pointe par rapport à ces différentes bactéries (images en niveaux de gris, figure 29).

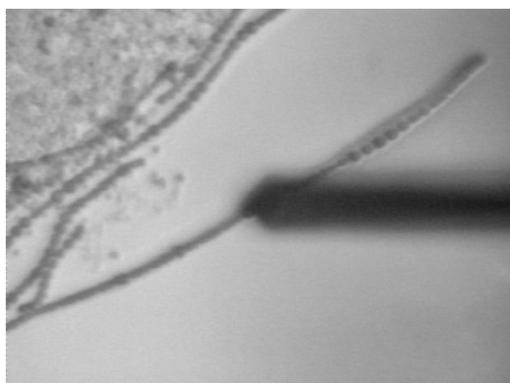


Figure 29 : Imagerie optique de cyanobactéries en atmosphère gazeuse sur le système couplé optique/AFM (l'ombre du levier AFM est visible sur cette image).

Les conditions d'imagerie, ainsi que la pointe AFM utilisée sont adaptées à chaque échantillon étudié, et seront donc mentionnés dans la partie « résultats » suivant l'essai.

L'imagerie AFM en atmosphère gazeuse, sur l'échantillon de cyanobactéries préparé comme décrit ci-dessus, nous a permis d'obtenir des images AFM dans des conditions assez faciles à réaliser (voir détail en partie « Résultats »).

1.5. Imagerie AFM en milieu liquide

1.5.1. Difficultés d'imagerie en milieu liquide

L'étape suivante est l'étude des bactéries par AFM en milieu liquide pour correspondre à nos besoins et pouvoir être combinée par la suite à la microscopie électrochimique. Cette étape, est très délicate. En effet, il est décrit dans la littérature que la microscopie à force atomique en milieu liquide est souvent périlleuse, compte tenu de la difficulté à maîtriser les forces qui s'exercent sur l'échantillon et le levier dans ce milieu. De plus les forces latérales exercées par la pointe sur la surface de l'échantillon rendent difficile l'imagerie et participent soit à le détériorer ou à le remettre en suspension.

Les essais ont été réalisés sur les mêmes échantillons utilisés pour les essais en atmosphère gazeuse, à savoir, lame de verre nettoyée à l'alcool (ou RBS dilué), 100 μ L de suspension bactériennes sont déposés directement sur cette lame, et laissés décanter 15 min. Ensuite

l'échantillon est placé sur le porte échantillon de l'AFM, et quelques gouttes de milieu BG11 sont injectées par micropipette (entre la tête AFM et la surface de l'échantillon).

Même avec des conditions d'imagerie relativement douces, en variant les modes d'imagerie, le type de pointes et les constantes de raideur des leviers, les bactéries étaient déplacées lors du mouvement de la pointe. Les filaments de cyanobactéries étaient cassés par le mouvement de scan et emportés, ce qui empêchait toute image d'être prise (voir partie « Résultats »).

1.5.2. Imagerie AFM en milieu liquide avec immobilisation

Toutes les difficultés rencontrées lors de l'imagerie des bactéries en milieu liquide, nous ont conduit à rechercher des protocoles qui donneraient des résultats plus satisfaisants. Ainsi que le suggérait la littérature où l'immobilisation forcée des bactéries par l'utilisateur était décrite comme incontournable, des essais d'immobilisation ont été entrepris.

Successivement, des méthodes telles que l'immobilisation à la poly-L-lysine [1] ou sur film de titane [2], ont été testées, sans résultats satisfaisants. Ceci s'explique par le fait que les protocoles que nous avons suivis étaient inspirés de ceux décrits dans la littérature pour d'autres souches bactériennes, différentes des cyanobactéries et n'étaient donc pas adaptés à ces dernières. Toutes ces méthodes n'ont donc pas apporté de résultats probants. Par contre, l'immobilisation par traitement à la gélatine [3] s'est révélée être une méthode plus pertinente pour les cyanobactéries étudiées et a retenu notre attention pour mieux l'adapter à notre échantillon.

- **Immobilisation à la gélatine**

La méthode d'immobilisation à la gélatine a d'abord été utilisée en suivant scrupuleusement ce qui était décrit dans le protocole de Docktycz *et al.*, 2003[3]. Dans ce dernier, le protocole a d'abord été établi en travaillant sur la bactérie Gram négatif, *Rhodospseudomonas palustris*, et ensuite sur *Staphylococcus aureus* (Gram +) et *Escherichia Coli* (Gram -). L'adaptabilité de cette méthode à différents types de bactéries, rend cette méthode intéressante pour nos essais. Nous avons suivi les étapes de préparation comme décrit dans ces travaux (figure 30): Ceci nous a permis d'obtenir des résultats, de loin, meilleurs à tous les autres protocoles d'immobilisation testés.

Protocole d'immobilisation des cyanobactéries pour imagerie AFM

- Préparation d'une solution composée de 500 mg de gélatine de porc (Gélatine G-2500, Sigma, type A) dilués dans 100 mL d'eau ultra pure (milli Q), sous agitation magnétique et chauffage à 60 °C.
- Une lame de verre est trempée dans ce mélange pendant 5 minutes, en position verticale.
- Cette lame est ensuite sortie du mélange gélatine-eau, et gardée en position inclinée pendant une nuit à température ambiante, sous un bécher pour éviter le dépôt de poussière pendant la nuit. L'ensemble n'était pas hermétiquement fermé afin que le séchage de la gélatine puisse se faire.
- Le lendemain, un prélèvement de suspension bactérienne de cyanobactéries est déposé par-dessus la lame traitée à la gélatine.
- Les bactéries se déposent, et après 10 minutes, la lame est ensuite rincée à l'eau ultra pure en utilisant une seringue, les bactéries non adhérentes sont éliminées par ce rinçage.
- La lame est placée sur le support porte échantillon de l'AFM, avec quelques gouttes d'eau injectées par une micropipette dans l'espace entre la tête AFM et la surface de l'échantillon.

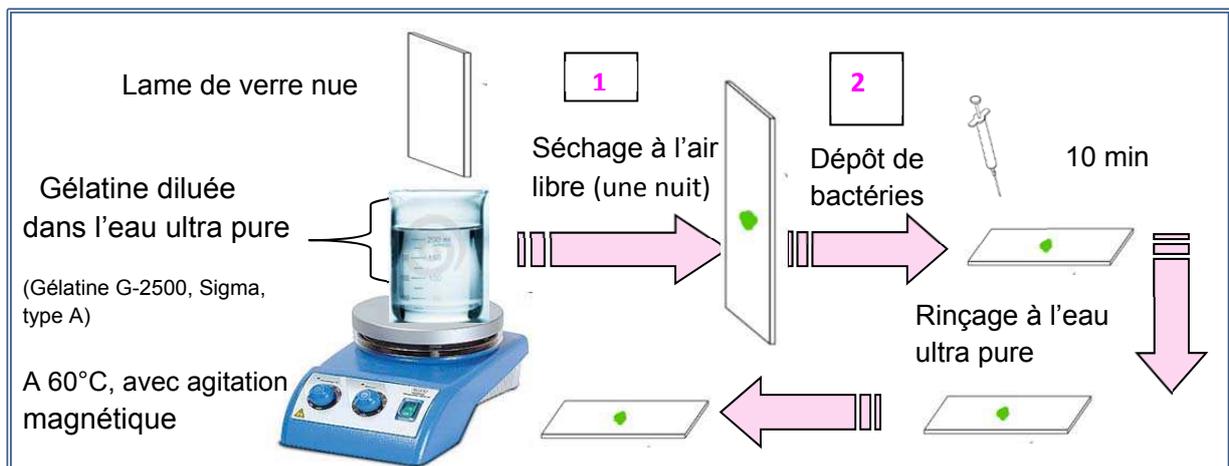


Figure 30 : Schéma expérimental d'immobilisation de cyanobactéries, sur lame de verre traitée à la gélatine, pour imagerie AFM en liquide [3].

Cependant ce protocole n'était pas totalement satisfaisant, aussi, différentes modifications ont été apportées à ces essais (concentration de la gélatine dans laquelle était trempée la lame de verre, la température de dissolution de la gélatine, la durée de l'immersion ou encore la durée

du séchage à l'air ambiant). Les modifications suivantes au protocole précédent ont été apportées :

- Fusionner les étapes 1 et 2 (figure 25) c'est-à-dire prélever dans la même seringue la suspension bactérienne et la gélatine dissoute dans l'eau ultra pure, mélanger et déposer le tout directement sur la lame de verre.
- dilution de l'agar (« Agar-agar », Sigma A1296) au lieu de la gélatine, dans le milieu de culture BG 11, au lieu de l'eau ultra pure. Il est à noter que l'agar est un produit gélifiant obtenu à partir de la paroi cellulaire d'algues rouges, il diffère de la gélatine par sa température de fusion de 85°C (contre 32-40°C pour la gélatine), d'où l'utilisation d'une température de 90°C dans notre protocole au lieu des 60°C utilisés précédemment.

L'ensemble de ces protocoles d'immobilisation nous ont permis d'imager des bactéries, cyanobactéries dans de bonnes conditions (voir partie « Résultats »).

Cependant, les bactéries ainsi imagées, du fait de leur immobilisation, sont mécaniquement « coincées », on n'est donc pas en capacité de voir leur comportement « réel ». En effet, ce confinement provoqué par l'étape d'immobilisation est différent de leur environnement naturel, et empêche un certain nombre de phénomènes bactériens d'être observés tels que le développement d'appendices extracellulaires, ou encore le mouvement et la mobilité des cellules bactériennes, qui sont des phénomènes de première importance dans les premières étapes de la formation d'un biofilm, qu'on cherche à étudier.

De plus l'introduction de substances telles que la gélatine ou l'agar, apporte des perturbations chimiques. Ces produits, en se déposant sur l'enveloppe bactérienne, peuvent modifier les propriétés membranaires et le métabolisme bactérien et, bien sûr, les propriétés topographiques et électriques mesurées. De plus, la dégradation progressive de la résolution spatiale de l'image AFM, lors des manipulations réalisées avec immobilisation à la gélatine ou à l'agar, nous a montré que ces substances contaminaient la pointe AFM qui scannait l'échantillon, et se déposaient petit à petit, au cours des mouvements de scan, sur la pointe ou, parfois même, sur le levier produisant des artefacts sur les images AFM réalisées.

Section 2 : Mise en place du Nanowizard 3

L'ensemble de ces inconvénients apportés par l'immobilisation et le besoin de s'en affranchir, a concouru avec l'acceptation du projet ANR, et la possibilité d'acquisition de nouveaux équipements. Nous nous sommes alors lancés dans l'installation d'une nouvelle salle de manipulation qui nous soit totalement dédiée « Nano-bio-géophysique » avec un certain nombre d'appareils nécessaires à nos expérimentations (figure 31).



Figure 31 : Salle expérimentale installée en octobre 2011, « NANO BIO GEOPHYSIQUE », Géosciences Montpellier.

2.1. Installation Nanowizard 3 et mode QI (Quantitative Imaging)

2.1.1. Le Nanowizard 3 et ses composantes

La principale acquisition, dans le cadre du lancement du projet ANR BioPHY et l'installation de la salle « nano-bio-géophysique » est le microscope à force atomique Nanowizard 3 de JPK (figure 27). Ce microscope présente de nombreux avantages par rapport au microscope Nanoscope III de Bruker ; tout d'abord il s'agit d'un AFM monté sur microscope optique inversé (Zeiss), permettant de travailler en couplage AFM/optique, et offrant la possibilité de travailler en milieu liquide (non pas par une goutte placée entre la lame et le porte pointe, mais en immersion totale dans une cellule) avec la possibilité d'association à des méthodes microbiologiques (telles que le marquage) et possibilité d'extension vers des méthodes optiques encore plus performantes (microscopie confocale, à fluorescence).

Cette cellule, où sont menées les différentes expérimentations, est une cellule électrochimique « Temperature controlled ECCell » de JPK (figure 32) permettant à la fois l'immersion de la partie AFM dans le liquide, pour une imagerie topographique de l'échantillon, mais aussi l'observation de ce dernier, en parallèle, par microscopie optique. La cellule électrochimique a une capacité maximale de 700 μL , sa température est contrôlée par un affichage instantané avec une possibilité de chauffage jusqu'à 60°C et elle est connectée à des électrodes, qui peuvent être reliées via un boîtier à un potentiostat pour des mesures électriques. Le fond de cette cellule est adapté aux lames de verre simples mais aussi aux lames de verre ITO. Il s'agit de lames de verre recouvertes, sur une de leurs faces, d'une couche d'oxyde d'indium dopé à l'étain (un mélange d'oxyde d'indium (III) (In_2O_3) et d'oxyde d'étain (IV) (SnO_2)). Cette couche présente deux principales caractéristiques, sa conductivité électrique et sa transparence optique. C'est pourquoi elle est utilisée dans nos essais pour servir de support aux bactéries étudiées.

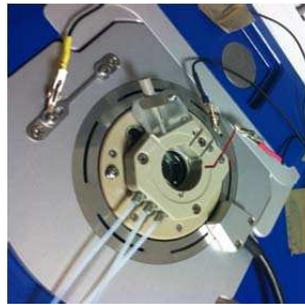


Figure32 : Cellule électrochimique « Temperature controlled EC-Cell » de JPK.

Une première phase a été consacrée à l'installation de ce nouveau microscope, à une formation avec un ingénieur de la société JPK pour la prise en main et la maîtrise de cet outil nouveau, et aux premiers essais. Par la suite, nous avons exploré un nouveau mode d'imagerie disponible par ce Nanowizard 3, qui est le mode QI (Quantitative Imaging).

2.1.2. Mode QI (Quantitative Imaging) et conditions d'imagerie

Le mode QI est un mode d'imagerie AFM où les forces latérales appliquées sur l'échantillon sont fortement diminuées. La force verticale (force d'appui) est quant à elle contrôlée par l'utilisateur. Ce mode est basé sur des courbes de force effectuées à chaque pixel de l'image AFM. La force exercée sur l'échantillon est contrôlée par le manipulateur. Pour résumer, le mode « Quantitative Imaging » :

- Mode approche retrait
- Minimisation extrême de la force latérale
- Contrôle de la force verticale (force d'appui) maximale à chaque pixel

Les premiers essais ont été effectués avec les cyanobactéries comme bactéries modèles, souche *Anabaenopsis circularis* PCC 6720, voir les conditions de culture dans la section 1. Plusieurs essais ont été nécessaires, pour trouver le protocole de préparation de l'échantillon le plus simple, rapide à mettre au point, permettant d'avoir un échantillon qui se prête à l'imagerie AFM en liquide. Au cours de ces expérimentations, nous avons réussi à mettre au point un protocole qui permettait d'imager les cyanobactéries en milieu liquide, sans passer par une étape préalable d'immobilisation. Il consiste à suivre les étapes suivantes :

- Prélèvement stérile d'1 mL de suspension bactérienne (cyanobactéries),
- Quand les cyanobactéries étaient agglomérées en amas compacts dans la phase liquide, une étape de sonication (de l'ordre de 2- 3 minutes) était appliquée. Nous avons vérifié que ceci n'avait pas de conséquences détectables sur la viabilité des bactéries,
- Vortex pendant 1 minute,
- Prélèvement de 40 μ L de bactéries,
- Dépôt sur une lame de verre, ayant des dimensions adaptées à la cellule électrochimique, préalablement nettoyée à l'alcool,
- Laisser décanter pendant 15 minutes,
- Aspiration, avec micropipette du surplus de liquide,
- Laisser évaporer le surplus de liquide à l'air (typiquement 3-5 minutes) ;
- Rinçage à l'eau ultra pure,
- Rinçage avec le milieu de culture correspondant aux bactéries à étudier (ici le milieu BG11),
- Placement de la lame avec l'échantillon ainsi préparé dans la cellule électrochimique,
- Ajout de 500 μ L de milieu BG11

Observation optique et par microscopie à force atomique avec le mode Quantitative Imaging (Qi). Les paramètres qui contrôlent l'imagerie, ont été modifiés un à un afin d'avoir les meilleurs résultats possibles. Et après plusieurs essais, nous avons retenus les valeurs typiques suivantes :

I Gain*: 50 HZ

P Gain*: 0.001

Set point*: 1.8 nN

Z length*: 500 nm

Extend time*: 4 ms

Retract time*: 4 ms

Add retract*: 100 nm

*Les deux termes « IGain » et « PGain » représentent des paramètres relatifs à la commande de la boucle de rétroaction pour la correction de la hauteur en Z, durant l'approche de la pointe de la surface de l'échantillon pour l'imagerie ; ils contrôlent la vitesse de la rétroaction. « IGain » représente une constante de temps, alors que le « PGain » est un amplificateur proportionnel à l'ajustement de la boucle de rétroaction.

*Le « Setpoint » représente la force maximale, prédéfinie, qui doit être atteinte au cours de la spectroscopie QI. Cette consigne représente la valeur de la déviation verticale du levier lors du contact de la pointe avec la surface de l'échantillon (plus la consigne est importante, plus la force de contact est grande).

*Le « Z length » représente la distance à partir de laquelle, le mouvement piézoélectrique durant l'approche ou le retrait est enregistré.

*« Extend Time » et « Retract Time » correspondent aux temps nécessaires au piézo pour l'extension ou la rétraction respectivement.

*« Add Retract », la distance supplémentaire de retrait en Z de la pointe, en passant d'un pixel à un autre de l'image AFM.

La combinaison du mode de préparation de l'échantillon et de ces choix de paramètres d'imagerie, nous a permis, après tous les essais de perfectionnement, d'obtenir des images AFM des cyanobactéries dans leur milieu de culture BG 11, sans recours à une technique d'immobilisation agressive (voir partie « résultats »).

- Les pointes AFM utilisées (voir section 1)
- Calibration en spectroscopie de force des leviers AFM

Durant les différentes mesures AFM, une calibration a été réalisée à chaque utilisation de nouvelle pointe, afin de déterminer la valeur réelle de la constante de raideur. La méthode utilisée repose sur les travaux de Hutter, JL and Bechhoefer, J. 1993 [4]. Une sélection du mode « Force Spectroscopy » est faite (figure 33-a) suivie par l'approche de la pointe, puis le module de calibration « calibration Manager » (figure 33-b) est sélectionné, le scan

est lancé et un zoom sur la courbe obtenue est effectué. Ensuite, la fonction « fit range » est choisie pour sélectionner la pente de la courbe et obtenir une valeur « sensitivity » (figure 33-c), cette valeur est sauvegardée. Ensuite, dans l'onglet « Spring constant » est lancée ; la pointe est relevée et un zoom sur le pic de la courbe est effectué (figure 33-d), on obtient ainsi les propriétés réelles de la pointe utilisée (constante de raideur) qu'on va prendre en compte dans les mesures AFM qui seront réalisés.

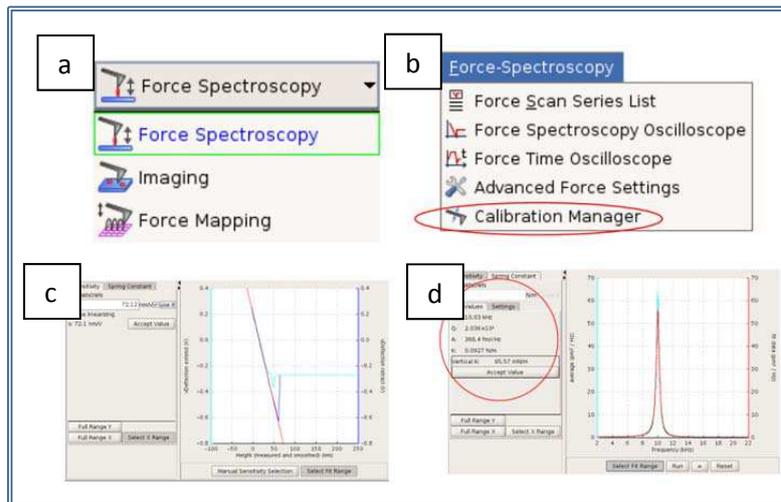


Figure33 : Procédure de calibration en spectroscopie de force des leviers AFM.

2.2. Matériel biologique et bactéries utilisées sur Nanowizard 3

En plus des cyanobactéries, les essais ont été menés sur d'autres types de bactéries, tout d'abord *Rhodococcus wratislaviensis*, bactérie d'intérêt du projet ANR, et ensuite sur d'autres bactéries afin de vérifier l'application de notre protocole de préparation, ainsi que les paramètres choisis, sur un large éventail de bactéries.

2.2.1. *Rhodococcus wratislaviensis*

Il s'agit des bactéries d'intérêt du projet ANR BioPHY, Nous avons travaillé sur la souche « *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016 », (IFP EN, Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles, Mme Françoise Fayolle-Guichard et Mr Yves Benoît), brevetée pour sa capacité à dégrader des composés pétroliers multiples en solution dans des effluents aqueux [5]. Il s'agit de bactéries à Gram positif, non mobiles et aérobies. A partir d'une préculture fournie par l'IFP-EN, une culture est lancée, dans le milieu MM [6].

Composition du milieu MM :

MgSO₄, 7H₂O à 0.5 g.L⁻¹

NH₄NO₃ à 1.5 g.L⁻¹

CaCl₂, 2H₂O à 0.04 g.L⁻¹

- Solution de phosphate à 10 mL.L⁻¹
KH₂PO₄ à 140 g.L⁻¹
- Solution d'oligo-éléments « 1 » à 1 mL.L⁻¹
CoCl₂, 6 H₂O à 1 g.L⁻¹
MnSO₄, H₂O à 1 g.L⁻¹
ZnSO₄, 7H₂O à 1 g.L⁻¹
AlCl₃, 6H₂ à 0.4.L⁻¹
NiCl₂. 6H₂O à 0.25 g.L⁻¹
H₃BO₃ à 0.1 g.L⁻¹
CuSO₄, 5 H₂O à 0.1 g.L⁻¹
- Solution d'oligoéléments « 2 » à 1 mL.L⁻¹
NaMoO₄, 2H₂O à 1g.L⁻¹
NaWO₄, 2H₂O à 1g.L⁻¹
- Solution de FeSO₄, 7H₂O à 1g.L⁻¹ et quelques gouttes H₂SO₄ 1M
- Solution de vitamines
Biotine à 200 mg.L⁻¹
Riboflavine à 50 mg.L⁻¹
Acide nicotinamique 50 mg.L⁻¹
Panthoténate de calcium à 50 mg.L⁻¹
Acide p-aminobenzoïque à 50 mg.L⁻¹
Acide folique à 20 mg.L⁻¹
Thiamine à 15 mg.L⁻¹
Cyanocobalamine (vitamine B12) à 1.5 mg.L⁻¹

Le milieu MM est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, tandis que le reste des solutions sont stérilisées par filtration à travers un ensemble filtre-seringue avec des membranes avec un seuil de filtration de 0.22 µm (« filtres-seringues 514-0060 », VWR).

Les bactéries *Rhodococcus wratislaviensis* sont cultivées dans ce milieu, de façon aérobie. Le toluène est utilisé comme source de carbone et est rajouté à raison de 20 µL/100 mL, sous hotte à flux laminaire, toutes les 24 heures. La température d'incubation est de 30°C et les

cultures sont menées avec une agitation constante, l'espace vacant dans le récipient où se fait la culture est suffisant pour prévenir toute limitation d'oxygène durant la croissance. Le suivi de la croissance est réalisé par prélèvements et mesure de DO (Densité optique) à 660 nm par spectrophotométrie (figure 34).

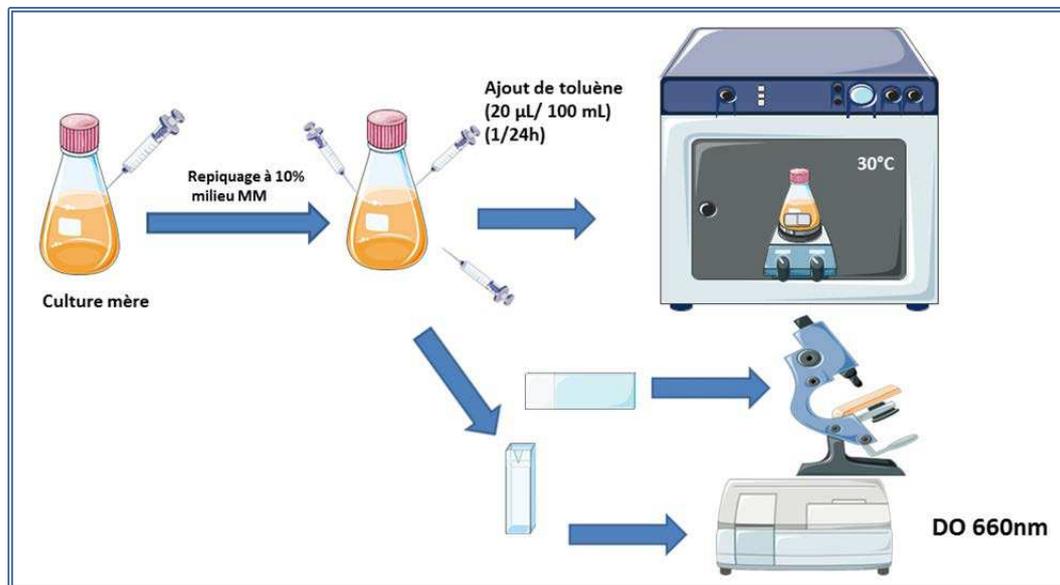


Figure34 : Culture de *Rhodococcus wratislaviensis*.

Le prélèvement des cellules bactériennes, préparation de l'échantillon sur la lame de verre et observation par AFM sont réalisés selon le même protocole décrit pour les cyanobactéries, à une différence près, celle du milieu utilisé pour la dernière étape de rinçage ainsi que pour les 500 µL placés dans la cellule électrochimique, il s'agit ici du milieu MM, milieu de culture des *Rhodococcus wratislaviensis*. Nous avons ainsi réussi à imager ces bactéries, de la même manière que les cyanobactéries (voir le chapitre « Résultats »).

2.2.2. *Lactococcus lactis*

Notre méthode ayant réussi sur deux types différents de bactéries, nous avons étendu nos essais à d'autres types de bactéries dans le cadre de collaborations. Ainsi, et en collaboration avec l'équipe « Bactéries lactiques et protéines de surface utiles » de l'UBLO (Unité Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes) rattachée au centre de recherches INRA UMR 1319 Micalis, AgroParisTech de Jouy en Josas, en la personne de Mr « Jean-Christophe Piard », nous avons cherché à tester notre protocole sur les bactéries « *lactococcus lactis* ». Il s'agit de bactéries à Gram positif, non mobiles, dont les cellules se présentent habituellement en paires ou en courtes chaînes, qui sont homofermentaires et hétérotrophes.

Le milieu de culture utilisé pour imager les bactéries « *Lactococcus lactis* » est le milieu M17 (code CM0817) sa formule, pour un litre d'eau distillée est la suivante [7]:

Tryptone 2,5 g

Peptone papainique de soja 5,0 g

Peptone pepsique de viande 2,5 g

Extrait de viande 5,0 g

Extrait autolytique de levure 2,5 g

Béta-Glycérophosphate de sodium 19,0 g

Sulfate de magnésium 0,25 g

D(+) Lactose 5,0 g

Acide ascorbique 0,5 g

Agar-agar bactériologique 15,0 g (pour le milieu M17 solide)

pH $6,9 \pm 0,2$

Une préculture est étalée sur le milieu solide (M17-agar coulé dans boîte de pétri, avec 0,5% de glucose et 5 $\mu\text{g/mL}$ d'érythromycine), puis incubée pendant 24 heures à 30 °C. Des colonies se développent à la surface. L'observation a été réalisée par AFM en liquide, de deux façons. Tout d'abord, (i) selon le même protocole que celui effectué pour les cyanobactéries et *rhodococcus wratislaviensis*, i.e. à partir d'une culture liquide. Une préculture est réalisée à partir de quelques colonies placées dans le milieu M17 liquide, et, après saturation, elle est repiquée dans du milieu M17 neuf. Au bout de six heures de croissance, un échantillon en est prélevé puis placé sur lame de verre (voir étapes décrites précédemment) pour observation en microscopie à force atomique (figure 35).

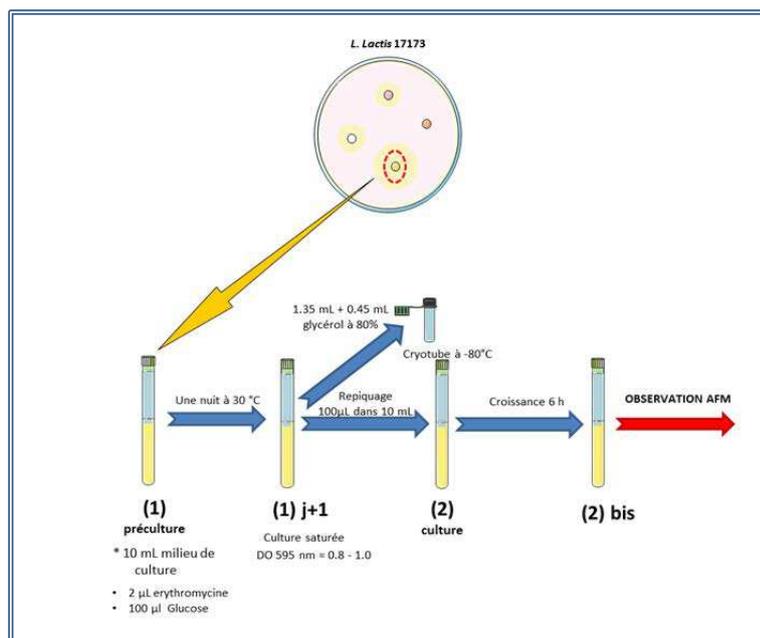


Figure 35 : Protocole expérimental de préparation d'échantillon de *Lactococcus lactis* (i) en vue d'imagerie par AFM en milieu liquide.

Aussi, (ii) l'observation a été réalisée selon un protocole qui intéressait particulièrement notre partenaire de l'UBLO, puisqu'il avait donné les meilleurs résultats en microscopie électronique : il consiste à préparer l'échantillon directement à partir d'une colonie de la souche *Lactococcus lactis* 17173 (sur milieu gélosé M17 agar avec 0,5% de glucose et 5 µg/mL d'érythromycine, sur boîte de pétri) et non à partir de culture liquide. Quelques colonies sont prélevées stérilement à l'aide d'une anse de platine et sont mise en suspension (délicatement) dans une grosse goutte de PBS (Phosphate-Buffered Saline) sur une lame ITO (nettoyée à l'alcool). Les bactéries sont observées dans la cellule électrochimique de l'AFM avec 500 µL de PBS.

2.2.3. Clostridium acetobutylicum (Cab) et Desulfovibrio vulgaris Hildenborough (DvH)

Une autre collaboration, cette fois avec le « Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines », UMR 7281, IMM-CNRS de Marseille, avec Mme Elisabeth Lojou et David Ranava a été menée. Les bactéries d'intérêt de cette équipe sont *Clostridium acetobutylicum* ATTC821 (Cab) et *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (DvH), l'objet de leur étude par cette équipe est la conception, la construction et l'étude de consortiums microbiens afin d'établir les paramètres régissant les réseaux d'interactions métaboliques avec pour objectif d'optimiser la production d'hydrogène.

La culture de ces bactéries se fait dans le milieu S⁻ L⁻ Y⁺ :

| | |
|---------------------------------|---------|
| NH ₄ Cl | 2 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g/L |
| Extrait de levure | 1 g/L |
| Oligoéléments | 1 mL/L |
| Glucose | 2.5 g/L |
| β-mercaptoéthanol | 0.01% |

Les cultures sont menées à 37 °C. Pour l'imagerie AFM, nous avons suivi le même protocole décrit précédemment, les résultats sont présentés dans le chapitre « Résultats ».

Section 3 : Couplage AFM système optique

3.1. Couplage AFM-suivi optique

Le dispositif expérimental est composé d'un microscope à force atomique, monté sur un microscope optique (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany), afin d'obtenir des mesures topographiques et optiques simultanément (figure 29). Ce microscope optique inversé, entièrement motorisé, permet la visualisation d'échantillons en transmission (fond clair, contraste de phase, DIC) ou en épifluorescence. L'illumination se fait par une lampe halogène pour les acquisitions en lumière transmise et repose sur un système de LED (le système colibri = module lampe + unité de contrôle + tableau de commande) pour l'imagerie en épifluorescence. Les objectifs disponibles sont les objectifs x10, x20, x40 et x63 (objectif à immersion) (figure 36).



Figure 36 : Microscope à force atomique (AFM) monté sur microscope optique inversé.

Le microscope optique est relié à un ordinateur, permettant de le piloter et de programmer différentes fonctions. On utilise la fonction « Snap » qui permet la prise de photo, « Exposure » si la préparation est trop ou pas assez exposée (entre 10 et 20 ms), et « Measure » grâce à laquelle la caméra propose un temps d'exposition automatique ou manuel, le pourcentage sélectionné est à situer entre 50% et 70% correspondant au pourcentage de saturation du capteur utilisé pour le calcul du temps d'exposition.

Il était important, pour les besoins des mesures à réaliser par la suite, d'avoir le suivi optique de la croissance bactérienne dans la cellule électrochimique au cours du temps. Cette dernière ayant une capacité maximale de 700 μL , il était impossible d'en prélever afin d'en mesurer la densité optique par spectrophotométrie classique (prélèvement minimum nécessaire pour cela de 2 mL à chaque prise). Nous avons programmé notre système afin de prendre des images optiques à intervalles réguliers (typiquement toutes les 10 minutes), pendant toute la durée de l'expérimentation (figure 37).

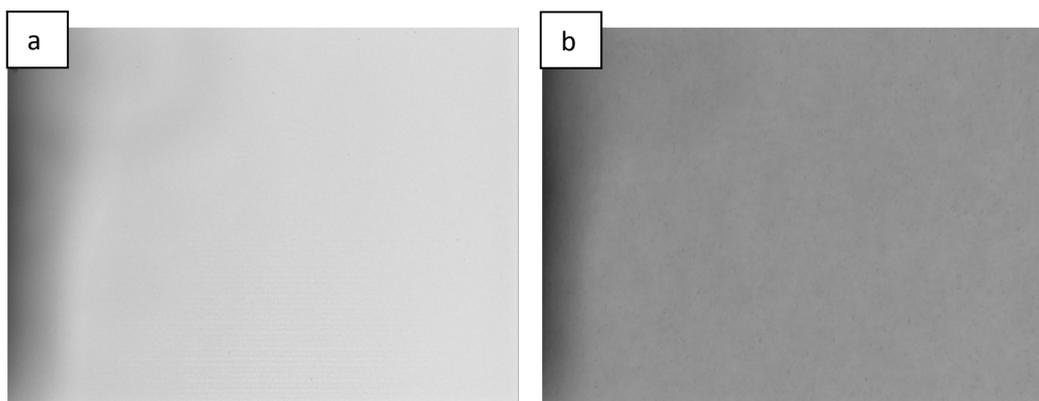


Figure 37 : Images optiques en transmission d'une culture bactérienne en cellule électrochimique (a : début de la manipulation, b : fin de la manipulation : 30 heures plus tard). Noter la diminution de l'intensité lumineuse, associée à l'augmentation de la turbidité elle-même liée à la croissance bactérienne planctonique. A ce grossissement, la croissance de cellules sur le substrat (plan objet observé par microscopie) n'est pas détectée.

Aussi, une méthode complémentaire a été mise au point, se basant sur le développement de cellules bactériennes à la surface de la lame de verre (premières étapes de développement d'un biofilm) en comptant directement le nombre de cellules qui apparaissent à l'image au cours du temps sur une zone de 100 μm (figure 38).

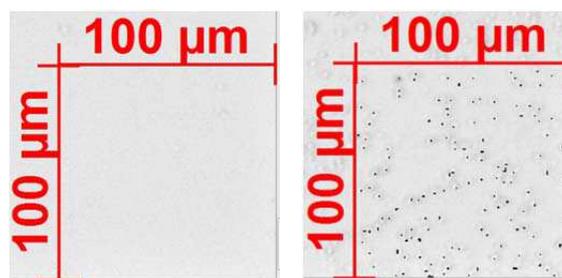


Figure 38 : Suivi de la croissance bactérienne par comptage direct de cellules sur les images optiques.

Enfin, une culture mère de plus grand volume (20 mL) est lancée en même temps afin de suivre la croissance bactérienne, et de la comparer à celle dans la cellule électrochimique, par mesure de DO (Densité Optique) à 660 nm par spectrophotométrie classique. L'ensemble de ces méthodes ont été superposées et de bonnes corrélations ont été trouvées, validant les deux nouvelles méthodes (voir partie « résultats »).

3.2. Traitement des images optiques et AFM

3.2.1. Traitement des images optiques et AFM pour suivi de déplacement de cyanobactéries

Dans le but de suivre de déplacement des cyanobactéries, des programmes matlab (Matalb labR 2011, « The Math Works Compagny, Natick, MA, USA) ont été développés (annexe 1), afin de suivre le mouvement de chaque cellule composant la chaînette de cyanobactéries (figure 39).

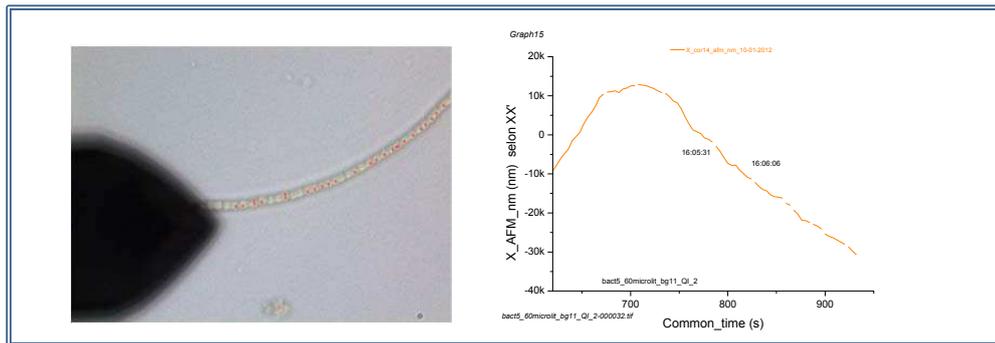


Figure 39 : Suivi de déplacement de cyanobactéries par pointage du déplacement des cellules.

Les informations obtenues, concernant le déplacement des cyanobactéries, par traitement des images optiques sont ensuite corrélées aux déplacements des cellules, observés lors de l'imagerie de cyanobactéries en mouvement par imagerie AFM (figure 40).

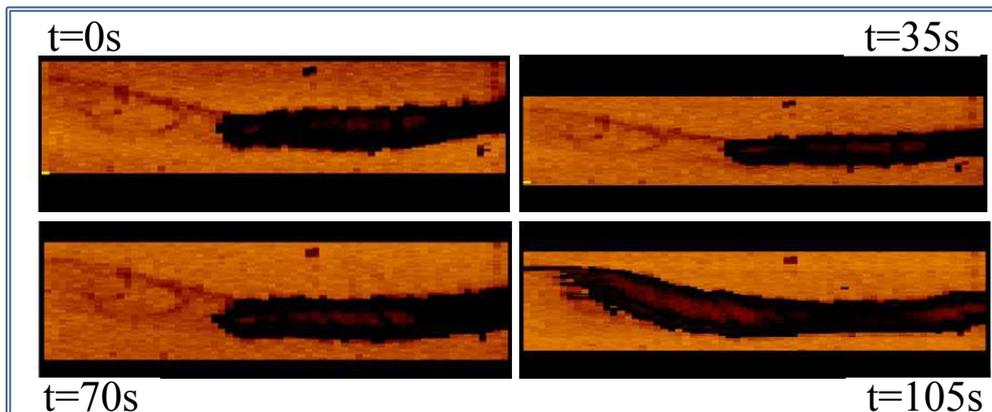


Figure 40 : Exemple d'imagerie AFM de cyanobactéries en mouvement.

Ensuite, les mesures obtenues par traitement des images optiques sont superposées aux mesures obtenues par AFM. Un exemple du déplacement de cyanobactéries mesurées par les deux outils (Figure 41).

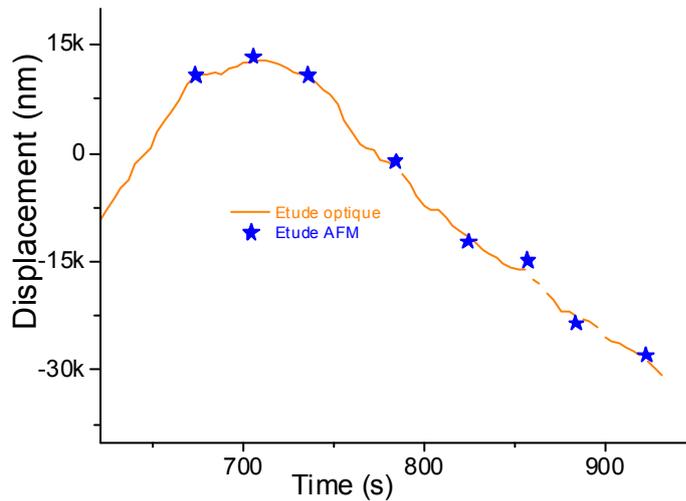


Figure 41 : Exemple de déplacement de cyanobactéries, par étude croisée des images optiques et des images AFM.

3.2.2. Traitement des images optiques pour suivi de la croissance bactérienne (DO)

Les images optiques prises toutes les 10 minutes sont traitées par la suite par un ensemble de programmes matlab développés (Matalb labR 2011, « The Math Works Compagny, Natick, MA, USA). Ces programmes (annexe 2) procèdent comme suit, tout d’abord ils permettent de mesurer l’intensité totale de l’image par mesure de l’absorption par le milieu contenant les cellules bactériennes planctoniques et d’en déduire la densité optique (DO) et la densité optique corrigée ($DO_{\text{corrigée}}$) rapportée au trajet optique du faisceau lumineux par le programme « lecture_image_Zeiss (DO) » (annexe 3).

Section 4 : Mesures électriques

4.1. Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam)

La microscopie électrochimique par sonde locale (en anglais Scanning Electro-Chemical Microscopy, SECM), est un outil innovant qui permet l'étude in-situ et de façon non destructive des structures et des processus électro-chimiques de systèmes de taille micrométrique. Afin de combiner la microscopie à force atomique à la microscopie électrochimique, il est indispensable d'avoir un levier adapté aux mesures électrochimiques locales (figure 42). Ce levier doit être fabriqué avec une très haute précision pour présenter une partie électro active bien définie et localisée.

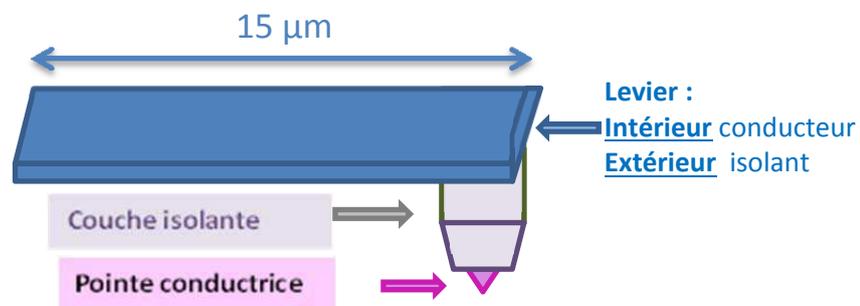


Figure 42 : Levier SECM-AFM.

En effet, l'extrémité de la pointe au bout du levier doit être conductrice et reliée électriquement à un contact macroscopique situé à l'extrémité arrière de la plaquette de « silicium » qui supporte le levier : à cet emplacement sera fait le contact par fil d'or pour la liaison électrique avec le potentiostat. La liaison entre la pointe AFM et le contact macroscopique en bout de levier doit être isolée électriquement du milieu extérieur liquide (figure 32).

Quelques méthodes sont décrites dans la littérature pour détailler les étapes de la fabrication d'un tel levier. Nous avons testé un premier type de méthode basé sur une approche chimique, avec différents types de polymères, mais les résultats n'étaient pas satisfaisants, notamment à cause de la mauvaise tenue dans le temps de ces polymères. Un autre type d'approche est la préparation de ces leviers par les techniques de dépôts et gravures utilisées dans l'industrie des semi-conducteurs : ces procédés sont complexes, coûteux et nécessitent des installations auxquelles nous n'avons pas accès. Nous nous sommes alors tournés vers d'autres méthodes décrites dans la littérature, et nous avons choisi d'en retenir une, celle de la « nano-fabrication » par FIB (Focused Ion Beam) ou sonde ionique focalisée [8]. Il est

important de préciser qu'au moment où nous nous sommes penchés sur la question aucun levier de ce type n'était proposé commercialement : seuls quelques rares laboratoires de par le monde maîtrisaient ces techniques et gardaient jalousement leurs leviers ainsi fabriqués.

4.1.1. Principe de la sonde ionique focalisée (FIB : Focused Ion Beam)

La sonde ionique focalisée (FIB) est un outil, développé en 1978 [9], utilisé couplé à un microscope électronique à balayage (MEB). Le "FIB", comme son nom l'indique, utilise un faisceau d'ions focalisés permettant de faire des dépôts et gravures sur des zones très petites (valeur minimale de quelques nanomètres), alors que le MEB utilise un faisceau d'électrons focalisés pour visualiser l'échantillon et le procédé de dépôt/gravure en temps réel (figure 43).

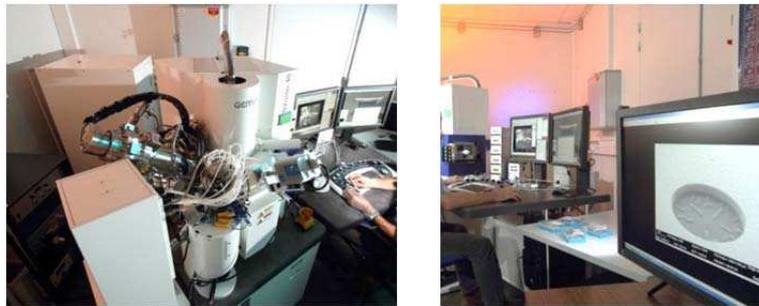


Figure 43: Sonde ionique focalisée, FIB (Focused Ion Beam) .

Le FIB est constitué d'une colonne ionique montée sur un microscope électronique à balayage. Son fonctionnement repose sur une source d'ions : la plus largement utilisée est la source liquide-métal (LMIS : Liquid Metal Ion Sources) en particulier la source "Gallium LMIS (ce composé est utilisé car il est caractérisé par une température de fusion basse 29.8°C, une faible volatilité, une faible pression de vapeur et de bonnes caractéristiques d'émission). Cette source est placée en contact avec une pointe de tungstène chauffée. Le gallium mouille alors le tungstène et la pointe est polarisée positivement par rapport une électrode extractrice formant une goutte de métal liquide à son bout, à partir d'un champ électrique, cette dernière prend la forme d'un cône appelé « cône de Taylor » à partir duquel les ions sont émis. Ces ions extraits de la source sont accélérés à une énergie comprise entre 1 et 50 keV et sont focalisés par des lentilles électrostatiques et projetés sur l'échantillon. La tâche de focalisation du faisceau d'ions a un diamètre de quelques nm (en moyenne 2 nm) [10]. Le FIB peut être utilisé pour réaliser une abrasion ionique, en creusant, à l'aide de ce faisceau d'ions des tranchées sur le substrat utilisé. Aussi, par ce même outil, le FIB, nous sommes capables de déposer des matériaux, « déposition induite par faisceau d'ions » (IBID Ion Beam Induced Deposition). Il s'agit d'un dépôt chimique en phase vapeur assisté par FIB

qui se produit lorsqu'un gaz comme l'hexacarbonyle de tungstène ($W(CO)_6$), ou encore le methylcyclo-pentadienyl platinum trimethyl ($(CH_3)_3(CH_3C_5H_4) Pt$), est injecté au voisinage de la surface à traiter. Ce gaz précurseur est décomposé sous le faisceau d'ions et le métal se dépose à la surface de l'échantillon. [11].

4.1.2. Essais réalisation leviers AFM-SECM

Des essais ont été réalisés, en utilisant ce procédé FIB, pour la fabrication de leviers AFM-SECM. Une première série d'essais a été conduite à l'INSA de Lyon et a été effectuée sur des leviers nus (en Si_3N_4), en utilisant une source d'évaporation métallique de tungstène afin de réaliser un dépôt d'un rail conducteur reliant la pointe à la partie arrière de la plaquette portant le levier AFM, et d'isoler par la suite le tout, pour n'avoir que la pointe comme élément conducteur relié à un contact électrique à l'arrière de la plaquette portant le levier. Les résultats de ces essais seront exposés dans la partie « Résultats », il est cependant important de préciser quelques paramètres, le dépôt a été réalisé avec une inclinaison de 90° , une hauteur de dépôt de $70\mu m$, un courant de $150pA$, une résolution de 6000×4000 et un « pixel set factor » de 62 %. Cependant des vérifications par mesures AFM par la suite, ont montré qu'au lieu de réaliser un dépôt de tungstène, c'est une abrasion qui a eu lieu.

Ce dépôt étant mal maîtrisé et ne garantissant pas de résultats, une autre série d'expériences a été lancée, toujours à l'INSA de Lyon, afin de réaliser une abrasion. Ces essais ont été réalisés sur des leviers AFM ayant un revêtement de platine de 100 nm et de titane de 10 nm (donc conducteurs), afin d'y creuser deux tranchées isolant la pointe du reste du levier, et de couvrir par la suite l'ensemble d'une couche isolante de SiO_x . Ces essais ont été réalisés à l'aide de la même source d'évaporation métallique de tungstène, avec un courant de 700 pA , « dwell time » de 0.4, une résolution de 6000×4000 , une inclinaison de 54° et des tranchées de $3\text{ }\mu m$ de largeur, une longueur de $200\mu m$, une profondeur de 200 nm et une séparation entre les deux rails de $20\text{ }\mu m$. Ces essais ont été réalisés avec succès, cependant, leur application s'est heurtée à de nombreux problèmes (voir partie « Résultats »).

Ainsi, d'autres séries d'essais ont été réalisés à l'IMPMC (Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés) de Paris, où là, la source utilisée est une source d'évaporation métallique de platine. Ces essais ont consisté à déposer, sur un levier non conducteur, un rail de platine reliant la pointe à la partie arrière de la plaquette portant le levier AFM et de couvrir le tout d'une couche isolante. Des analyses par Conductive-AFM ont été ensuite réalisées sur le levier ainsi modifié par FIB afin de vérifier la

conductivité/isolation des différentes parties du levier. La conductive-AFM est une variation de l'AFM et de la microscopie à effet tunnel –STM-, qui utilise un courant électrique pour construire le profil de la surface de l'échantillon étudié. Le courant circule à travers la pointe du microscope revêtue de métal et l'échantillon conducteur. Cela permet de corrélérer un élément spatial sur l'échantillon avec sa conductivité. Les résultats seront détaillés en partie « résultats ».

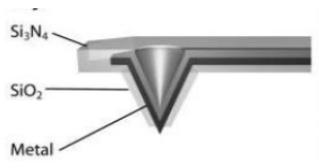
La technique FIB permet ainsi la préparation d'échantillons dont la réalisation est difficile voire impossible par d'autres techniques. Les pointes AFM-SECM fabriquées par FIB sont arrivées tardivement et peu de mesures électrochimiques concluantes (en montage couplé à un AFM) ont été faites. Nous avons donc préféré nous consacrer à un travail à une échelle intermédiaire (micromètre), pour des raisons pratiques, disponibilité de pointes, et techniques (signaux électriques plus grands).

4.2. Mesures AFM en mode électrique avec leviers/électrodes de taille micrométrique : une première approche de l'AFM-EC

Le développement du dispositif expérimental se fait donc à une échelle intermédiaire, plus pratique pour la mise au point des essais électriques combinés aux essais optiques et topographiques (AFM), car de mise en œuvre moins délicate et coûteuse que la fabrication des leviers AFM-SECM par FIB, donc opérationnelle plus rapidement que ces derniers. Mais ça représente une échelle intéressante par rapport à ce qui se fait en mesures électrochimiques, et surtout cette échelle intermédiaire est un passage obligé pour valider la méthode et la mettre au point.

La conception de ce dispositif a été réalisée en collaboration avec l'équipe de « JPK Instruments » (Berlin, Allemagne). Elle consiste à fixer un fil de cuivre sur le contact macroscopique déposé sur la plaquette de silicium portant le levier conducteur (partie arrière) pour récupérer le signal électrique par l'électronique de mesure. Ensuite, notre but est d'isoler, par dépôt d'un isolant électrique comme le vernis, la surface maximale de la plaquette porte-levier sans rompre ce dernier (forces capillaires). Le mode opératoire pour réaliser le contactage de la plaquette de silicium, support du levier, est détaillé ci-dessous avec le matériel nécessaire dans le tableau 2.

Tableau 2: Matériel utilisé pour la fabrication de levier “ElectroChemistryCantilever”.

| | |
|---|---|
| <p>a. Un levier AFM conducteur, « PPP-CONTPt »</p> |  |
| <p>b. Porte pointe “Glass block (super cut, extended)”</p> |  |
| <p>c. Fil de cuivre (diamètre 100 µm)</p> |  |
| <p>d. Colle epoxy conductrice</p> |  |
| <p>e. Colle epoxy (JPK)</p> |  |
| <p>f. Vernis transparent (dilué dans l’acétone)</p> |  |
| <p>g. Papier de verre</p> |  |
| <p>h. Ohmmètre</p> |  |

- **Les étapes de préparation de l' « ElectroChemistryLevier » :**

Un morceau de fil de cuivre isolé (c) est découpé, avec une longueur de 70 mm environ, ce choix d'épaisseur a été fait avec une contrainte, que ce fil soit assez solide pour être fixé et assez fin pour ne pas perturber l'approche de la pointe au moment de l'imagerie AFM). On utilise ensuite un papier de verre (g) pour enlever le revêtement isolant (étain) des deux extrémités du fil de cuivre. Une extrémité va être connectée à la plaquette porte-levier (a), l'autre bout sera relié à une petite pince crocodile directement connectée à l'électronique.

La pointe utilisée dans ces essais est la pointe « PPP-CONTPt » (PointProbePlus-Contact-Platinum,, « NanoAndMore ») avec revêtement de platine, avec un levier d'une longueur de 450 μm , largeur de 50 μm , une épaisseur de 2 μm , une constante de raideur de 0.2 N/m et une fréquence de résonance de 13kHz. Ce support de levier est fixé sur le porte pointe (figure 44) en utilisant le mélange de colle epoxy de JPK (e), on laisse sécher pendant une nuit à température ambiante.

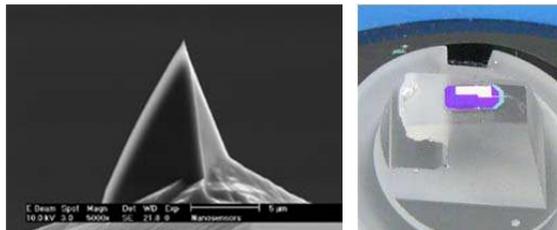


Figure 44: Levier « CONT-PT » fixé sur porte pointe.

Avec une paire de pinces, le fil de cuivre est manipulé pour suivre la forme de la face arrière du bloc de verre (cela doit correspondre à la forme du ressort métallique normalement utilisé pour maintenir la plaquette porte-levier). Ce fil de cuivre est fixé au bloc de verre à l'aide du mélange d'une colle à deux composants (figure 45).

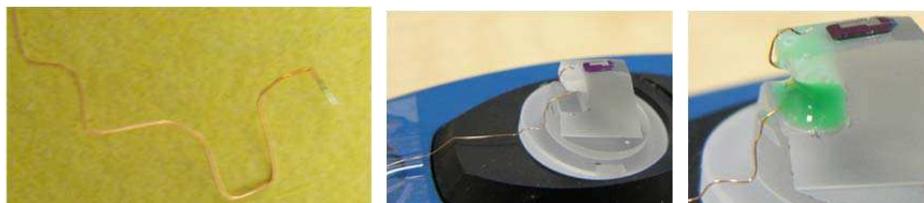


Figure 45: Liaison fil de cuivre-levier AFM sur bloc de verre.

Un embout de pipette de 10 μl est utilisé pour préparer un mélange d'une colle époxy conductrice (d). La viscosité doit être telle que, lorsque la pointe de la pipette est soulevée il y ait un fil visqueux. La petite quantité correspondant à ce fil visqueux est utilisée pour fixer

l'extrémité du fil de cuivre sur la face supérieure de la plaquette portant le levier. Il faut faire très attention à la quantité de colle epoxy déposée, car elle doit être suffisante pour créer un contact électrique, mais pas en quantité excessive, car l'approche pendant l'imagerie AFM par la suite deviendrait impossible si ce dépôt entrait en contact avec l'échantillon avant la pointe AFM. Il est à noter qu'il y a d'autres substances qui peuvent être utilisées à la place de la colle epoxy (la peinture conductrice d'argent par exemple, mais elle est beaucoup plus difficile à appliquer en petite quantité et est beaucoup moins stable car les particules d'argent peuvent diffuser).

On laisse la colle epoxy sécher pendant 12 h à température ambiante ou 1h15 à l'étuve à 110 °C. Un ohmmètre (h) est ensuite utilisé pour tester s'il y a bien une connexion électrique entre le levier et l'autre extrémité du fil de cuivre. Enfin, le maximum d'éléments conducteurs sur le dessus du bloc de verre, à l'exception du levier, sont couverts avec du vernis dilué (f), afin d'obtenir une couche mince et homogène. Le vernis est préalablement dilué dans de l'acétone dans une proportion qui dépend du vernis utilisé. Plusieurs essais ont été effectués et une valeur de 50-50 a été testée avec succès, donc retenue. On laisse sécher quelques minutes et on vérifie avec un ohmmètre que tout le montage est opérationnel (figure 46).

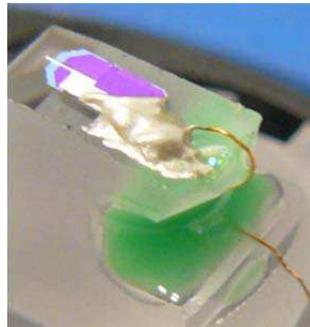


Figure 46: Montage « ElectroChemistryCantilever ».

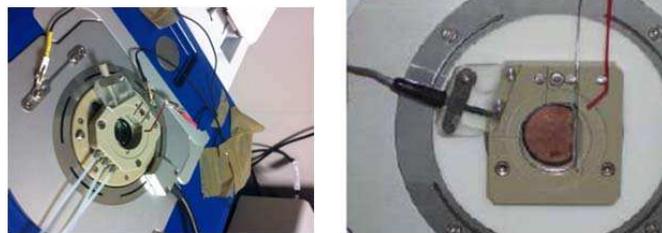
En utilisant la pointe ainsi montée, un couplage entre la microscopie à force atomique (AFM) et l'électrochimie (EC) et microscopie optique a été mis en place. La plaquette porte-levier est alors typiquement conductrice sur quelques centaines de micromètres-carré.

Montage expérimental

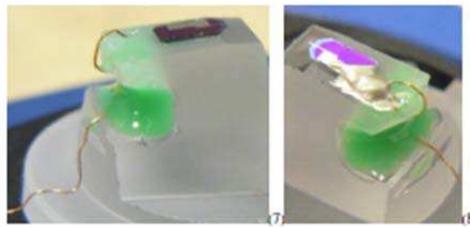


Microscope à force atomique (AFM) monté sur microscope optique.

Anneau platine → Contact ITO (échantillon)



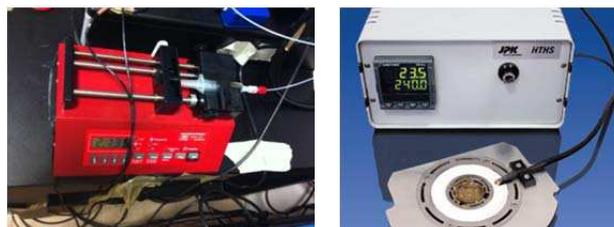
Cellule électrochimique avec lame ITO (Indium-Tin Oxyde) placée à l'intérieur



Montage utilisé « Electro-Chemistry Lever »



Branchement électrique reliant les électrodes au potentiostat (Solartron)



Pompe à seringue et régulateur de température de la cellule électrochimique

Le porte échantillon utilisé est une cellule électrochimique (JPK), où est placée la lame de verre recouverte d'une mince couche d'ITO (Indium-Tin Oxyde) support adapté à la combinaison de l'imagerie optique aux mesures électriques. Cette lame, conductrice sur sa face supérieure sur laquelle le dépôt bactérien est effectué constitue une des électrodes nous servant pour les mesures électriques : elle sera appelée dans la suite « électrode ITO ».

L'essai est conduit sur plusieurs heures dans la cellule électrochimique qui n'est pas fermée, le volume s'abaisse donc, modifiant l'état des bactéries, faussant les mesures de densité optique obtenues à partir des images optiques (qui sont rapportées à la hauteur du volume traversé par le faisceau lumineux). En compensation du volume évaporé, la cellule électrochimique est alimentée en permanence en milieu de culture. Cette alimentation est réalisée à l'aide d'une pompe à seringue KDS200 de « KD scientifique ». Après plusieurs essais, nous avons pu déterminer que le débit optimum, pour la compensation de l'évaporation, était de 100 μ L/heure. L'évolution temporelle des courbes de densité optique, que nous avons mesurées in-situ sur notre montage, étaient superposables avec celles obtenues, de manière « classique » (par prélèvements), sur des flacons de culture de grand volume (500ml).

Les différentes électrodes, l'une reliée à l'échantillon « électrode ITO », une autre reliée au levier AFM par le fil de cuivre, et la dernière reliée à un anneau de platine de la cellule électrochimique (figure 47), sont reliées à travers un boîtier à un potentiostat Solartron, piloté par ordinateur grâce au logiciel « Modulab System Operating Software ». Les essais ont été réalisés en mode 2 ou 3 électrodes, les branchements seront spécifiés à l'analyse des résultats obtenus (partie « résultats »).

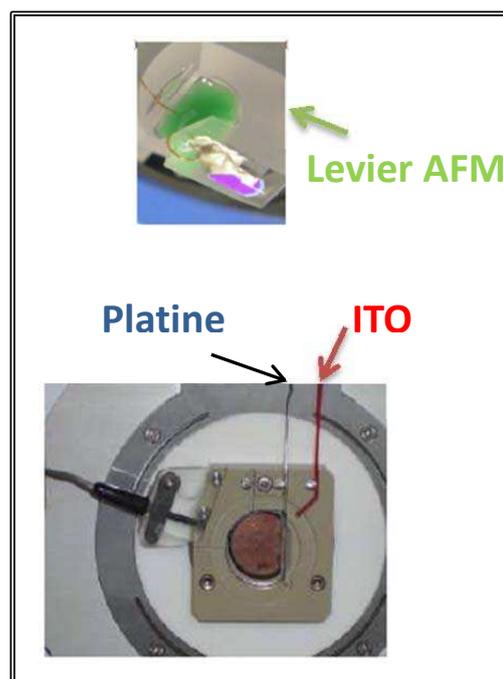


Figure 47: Cellule électrochimique et électrodes utilisées :

- pointe AFM
- anneau de platine
- ITO (échantillon).

Références bibliographiques

1. Yamashita H, Taoka A, Uchihashi T, Asano T, Ando T, et al. (2012) Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM. *J Mol Biol* 422: 300–309. doi:10.1016/j.jmb.2012.05.018.
2. Ivanova EP, Truong VK, Webb HK, Baulin VA, Wang JY, et al. (2011) Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Sci Reports* 1. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3240996/>. Accessed 5 July 2013.
3. Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, et al. (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97: 209–216. doi:10.1016/S0304-3991(03)00045-7.
4. Hutter JL, Bechhoefer J (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* 64: 1868–1873. doi:10.1063/1.1143970.
5. Auffret M, Labbe D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F (2009) Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl Environ Microbiol* 75: 7774–7782. doi:10.1128/AEM.01117-09.
6. Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele J-P, Monot F (2001) Biodegradation of tert -butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 369–373. doi:10.1007/s002530000545.
7. Terzaghi BE, Sandine WE (1975) Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl Microbiol* 29: 807–813.
8. Wiedemair J, Moon JS, Reinauer F, Mizaikoff B, Kranz C (2010) Ion beam induced deposition of platinum carbon composite electrodes for combined atomic force microscopy-scanning electrochemical microscopy. *Electrochem Commun* 12: 989–991.
9. Seliger RL, Ward JW, Wang V, Kubena RL (1979) A high-intensity scanning ion probe with submicrometer spot size. *Appl Phys Lett* 34: 310–312. doi:10.1063/1.90786.
10. Giannuzzi LA, Stevie FA (2005) Introduction to focused ion beams instrumentation, theory, techniques, and practice. New York: Kluwer Academic Publishers. Available: <http://ebooks.springerlink.com/UrlApi.aspx?action=summary&v=1&bookid=128274>. Accessed 5 July 2013.
11. Ali MY, Hung W, Yongqi F (2010) A review of focused ion beam sputtering. *Int J Precis Eng Manuf* 11: 157–170. doi:10.1007/s12541-010-0019-y.

Contenu

| | |
|---|------------|
| RESULTATS & DISCUSSION | 83 |
| SECTION 1 : IMAGERIE AFM..... | 84 |
| 1.1. <i>Imagerie AFM en atmosphère gazeuse</i> | 84 |
| 1.2. <i>Imagerie AFM en milieu liquide</i> | 86 |
| 1.3. <i>Imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation</i> | 87 |
| 1.3.1. Essais d'imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation..... | 87 |
| 1.3.2. Limites et contraintes..... | 93 |
| SECTION 2 : ETUDE AFM EN MILIEU LIQUIDE DE BACTERIES SANS IMMOBILISATION..... | 94 |
| 2.1. <i>Imagerie AFM en milieu liquide sans immobilisation</i> | 94 |
| 2.1.1. Cyanobactéries..... | 94 |
| 2.1.2. <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> | 96 |
| 2.1.3. <i>Lacotococcus lactis</i> | 100 |
| 2.1.4. <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Cab) et <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH)..... | 102 |
| 2.1.4.2. <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (DvH)..... | 103 |
| 2.1.4.3. Coculture Cab-DvH..... | 104 |
| 2.2. <i>Etude topographique et mécanique par AFM sur les cyanobactéries</i> | 105 |
| 2.2.1. Présentation de l'étude..... | 105 |
| 2.2.2. Publication « «In-situ determination of the mechanical properties of gliding or non-motile bacteria by Atomic Force Microscopy under physiological conditions without immobilization»..... | 108 |
| SECTION 3 : MESURES AFM COMBINEES A DES MESURES ELECTROCHIMIQUES..... | 131 |
| 1.1. <i>Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam)</i> | 131 |
| 1.1.1. Essais à l'INL de Lyon..... | 131 |
| 1.1.2. Essais à l'IMPMC Paris..... | 133 |
| 1.2. <i>Mesures électriques et électro-chimiques en mode approche-retrait (QI de JPK)</i> | 135 |
| 1.2.1. Expériences électriques en mode I(V) en différents endroits quasi-ponctuels..... | 136 |
| 1.2.2. Expériences électriques en imagerie QI à potentiel électrique constant..... | 149 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 153 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 155 |

Résultats & discussion

Section 1 : Imagerie AFM

1.1. Imagerie AFM en atmosphère gazeuse

Les premières étapes d'imagerie ont été réalisées en atmosphère gazeuse, car plus simples à maîtriser et essentielles pour apprendre la technique d'imagerie AFM et se familiariser à ses différents aspects. Pour des raisons d'ordre pratique, la mise en place de ce dispositif expérimental, a été réalisée avec comme échantillon biologique de bactéries modèles « les cyanobactéries » (souche *Anabaenopsis circularis* PCC 6720). Les conditions de culture et de préparation sont détaillées dans la partie « Matériel & méthodes ».

Les premières images AFM ont été réalisées à l'air sur des cyanobactéries et sont présentées ci-dessous (figure 48).

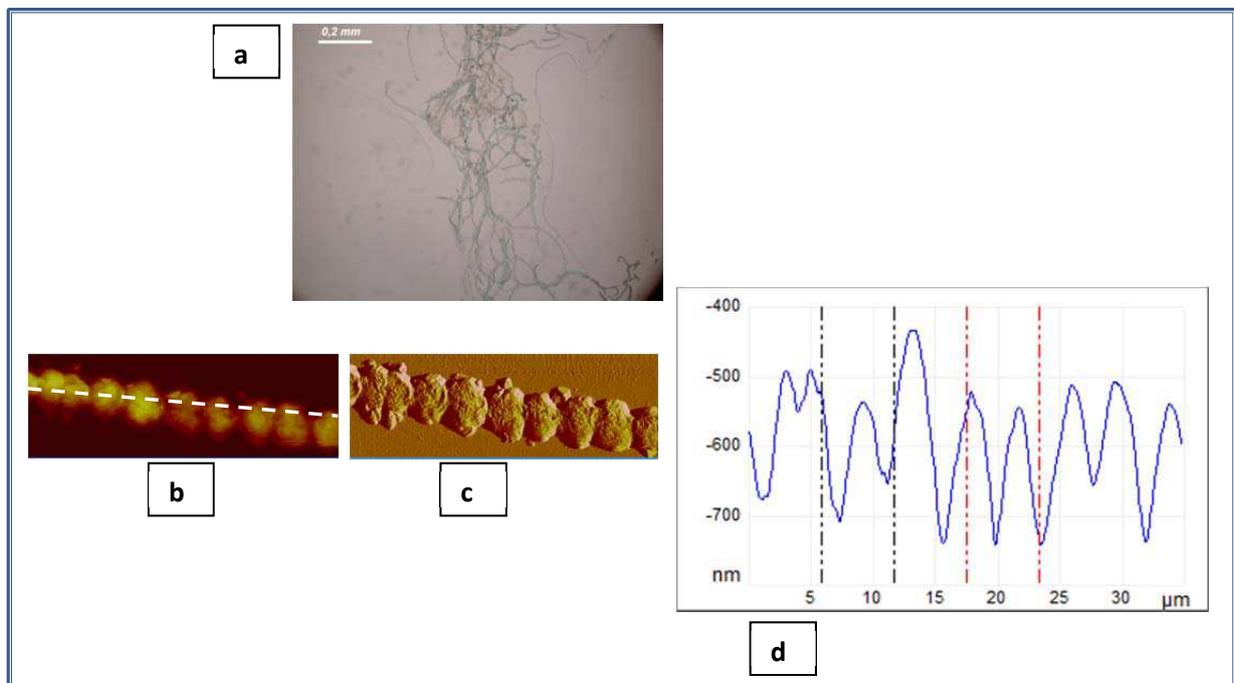


Figure 48 : (a) : Image optique de cyanobactéries sur lame de verre (a) ; le trait blanc représente une longueur de 0,2mm. (b-d) : Images AFM en atmosphère gazeuse de cyanobactéries. La longueur (sur l'horizontale) de ces images est de 35µm. (b) : hauteur : échelle de couleur : 1.5µm ; (c) : amplitude (signal d'erreur) : échelle de couleur : 1V ; (d) profil de hauteur le long de la ligne visible sur l'image (b).

L'image AFM a été acquise en mode « tapping » avec une largeur de balayage de 35 µm et une force d'appui de 10nN. La pointe utilisée est une pointe EFM (PPP-EFM, PontProbe Plus Electrostatic Force Microscopy) voir la partie « Matériel et Méthodes » pour plus de détails. Les cyanobactéries apparaissent sous forme de chaînettes composées de plusieurs cellules. Le profil de hauteur montre des cellules de 5 µm de diamètre en moyenne, et de hauteur variant

de 100 nm à 300 nm. La familiarisation avec la technique nous a permis de réaliser plusieurs images à l'air et quelques-unes ont retenu notre attention car présentant des éléments intéressants. On peut en citer à titre d'exemple la figure 49.

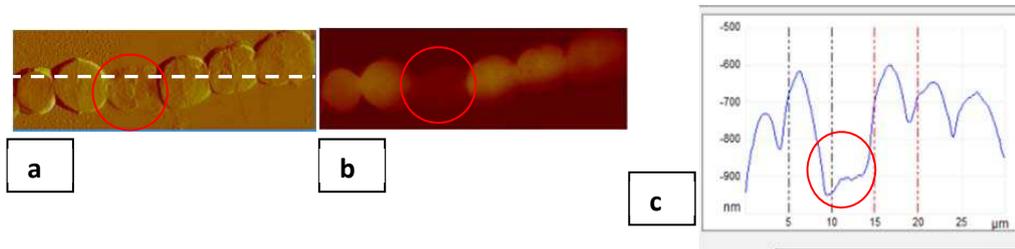


Figure 49 : Images AFM (mode tapping) en atmosphère gazeuse de cyanobactéries, longueur : 30 μ m : (a) : amplitude, échelle de couleur : 1V ; (b) : hauteur, échelle de couleur : 3 μ m. (c) profil de hauteur suivant la ligne visible sur l'image (b).

On remarque sur cette image topographique de cyanobactéries, réalisée en utilisant une pointe EFM (PPP-EFM, PontProbe Plus Electrostatic Force Microscopy) et obtenue à l'air, un élément intéressant. En effet, il y a une cellule, plat par rapport aux restes des cellules composant la chaînette de cyanobactéries. Cette différence, n'est pas visible par microscopie optique. Sur le profil de hauteur, On remarque une hauteur moyenne de 300 nm pour l'ensemble des cellules, à l'exception d'un seul (encerclé en rouge sur la figure 49), correspondant en profil de hauteur, à un élément plat, ceci pourrait représenter une cellule morte, pour laquelle la paroi se serait décomposée ou aurait été percée et le contenu intracellulaire déversé en dehors de la cellule. Un autre exemple peut aussi être cité : il s'agit d'images AFM de cyanobactéries (figure 50) réalisées en mode contact, en utilisant une pointe pyramidale NPS avec une constante de raideur de 0.06 N/m.

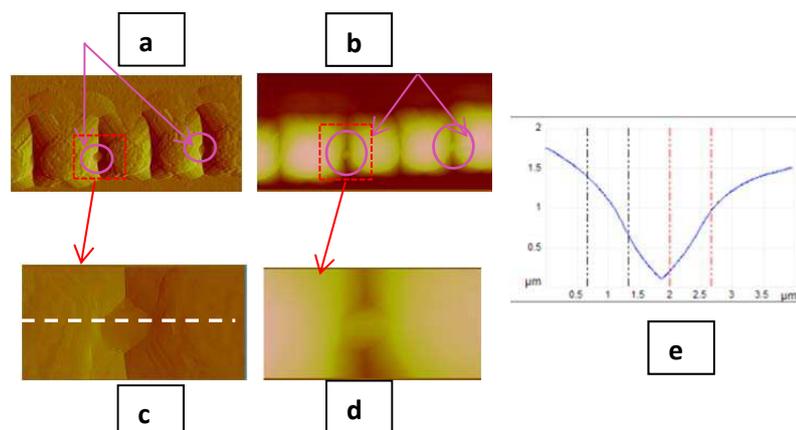


Figure 50 : Images AFM en atmosphère gazeuse de cyanobactéries montrant la présence d'éléments liant des cellules entre elles. (a-b) : longueur : 30 μ m ; (c-d) : longueur : 4 μ m : (a et c) : amplitude, échelle de couleur : 0.5V ; (b et d) : hauteur, échelle de couleur : 4 μ m. (e) profil de hauteur suivant la ligne visible sur l'image (c).

Une image topographique d'une chaînette de cyanobactérie a permis de mettre en évidence des « ponts » reliant les différentes cellules composant l'ensemble de la chaîne : plusieurs images ont été alors acquises successivement et ont montré de manière claire l'existence de ces « ponts ». Ces images AFM, centrées sur la zone intercellulaire (entre deux cellules) (figure 50.c-d) (dimensions latérales de l'image : 4 μm), ont permis d'observer de manière nette des jonctions de 700 nm de diamètre. Ces éléments observés pour la première fois, à notre connaissance, sur des cyanobactéries par microscopie à force atomique pourraient correspondre aux pores de jonction (« junctional pore complex »). La présence de pores ou de perforations dans la couche peptidoglycanique de la paroi des cyanobactéries filamenteuses ont été mis en évidence dès 1955 [1], leur rôle serait de faciliter les échanges entre les cellules du filament et avec le milieu extérieur, mais faute de moyens d'investigation adaptés, ils sont encore mal caractérisés. L'outil AFM, par des études en milieu liquide, pourrait donc apporter des informations précieuses sur les caractéristiques de ces éléments et la compréhension de leur mode de fonctionnement.

1.2. Imagerie AFM en milieu liquide

L'imagerie AFM doit être réalisée en milieu liquide pour pouvoir correspondre aux besoins de nos expérimentations futures et permettre d'observer les bactéries dans des conditions physiologiques plus proches de leur état naturel. Nous nous sommes donc lancés dans cette tâche en déposant directement une suspension bactérienne de cyanobactéries sur une lame de verre puis une goutte de milieu BG11 était injectée par micropipette entre la tête AFM et la surface de l'échantillon. Les bactéries étaient déplacées lors du mouvement de la pointe (figure 51). Les filaments de cyanobactéries étaient automatiquement cassés par le mouvement de la pointe et emportés plus loin ce qui empêchait toute image d'être prise correctement (figure 52).

En optique, en comparant l'état des chaînettes de cyanobactéries avant le début du mouvement de scan par la pointe (figure 51 cercle vert « avant ») à celui après son passage (figure 51 cercle rouge « après»), on remarque très bien l'impact du scan de la pointe, qui décolle complètement la bactérie de la surface du substrat et déplace les différentes cellules composant la chaînette.

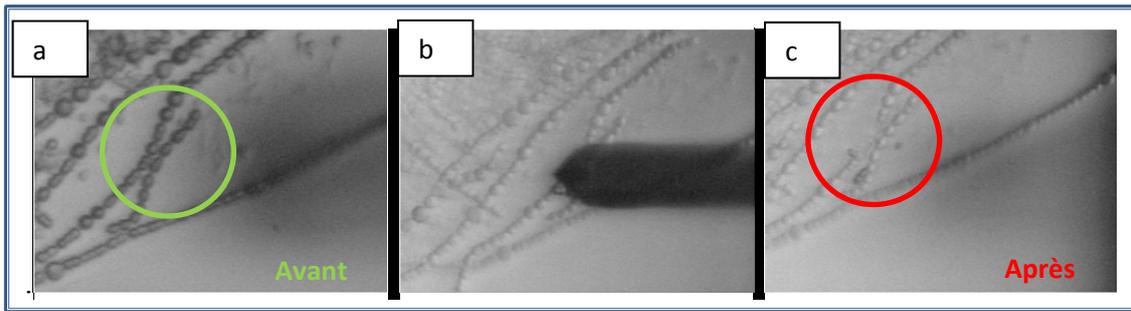


Figure 51 : Image AFM en milieu liquide, de cyanobactéries (a. avant, b. pendant et c. après l'imagerie AFM et le scan de la pointe).

Ceci se répercute sur les images AFM, comme à titre d'exemple l'image AFM en milieu liquide (figure 52), représentant des essais réalisés avec une pointe FM (2.5 N/m) en mode « tapping » (force d'appui : qq nN). En effet, les bactéries ont été déplacées par le mouvement de la pointe, et ne sont donc pas imageables. L'image AFM obtenue est inexploitable puisque sans information sur la topographie de la bactérie.

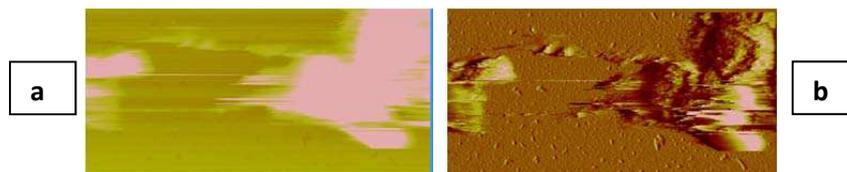


Figure 52 : Imagerie AFM de cyanobactéries en milieu liquide. Largeur de l'image : 20 μ m : (a) : hauteur, échelle de couleur : 1.5 μ m (b) : amplitude/signal d'erreur.

L'étude en phase liquide sur ces bactéries s'est ainsi avérée très délicate. L'échec, de ces essais, nous a conduits à rechercher des protocoles qui donneraient des résultats plus satisfaisants. La consultation de la littérature a révélé une constante qui revenait dans tous les travaux de recherche menés pour imager des objets biologiques par AFM en milieu liquide, celle de l'immobilisation. En effet, cette étape était décrite comme inévitable pour pouvoir réussir à relever un tel challenge.

1.3. Imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation

1.3.1. Essais d'imagerie AFM en milieu liquide après immobilisation

L'AFM présente la capacité d'imager des cellules bactériennes, dans un environnement liquide, sans la nécessité de traiter l'échantillon comme dans le cas, par exemple, de la

microscopie électronique. Cependant une contrainte de taille reste : l'échantillon doit suffisamment adhérer à la surface afin de résister aux forces latérales exercées par la pointe AFM pendant l'imagerie. Ainsi, le succès de l'imagerie en milieu liquide dépend de l'immobilisation de l'échantillon à la surface du substrat. Idéalement, l'immobilisation devrait être le moins invasive possible pour l'échantillon biologique, de sorte que les processus métaboliques et attributs fonctionnels ne soient pas compromis.

Différentes méthodes d'immobilisation sont décrites dans la littérature scientifique. Nous en avons testé quelques-unes, immobilisation en traitant la surface d'une lame de verre à la poly-L-lysine [2], sur film de titane [3], mais l'imagerie des bactéries restait difficile malgré l'utilisation de ces techniques sur l'AFM utilisé au service commun de microscopie à champ proche de l'université Montpellier 2, que ce soit en mode contact ou en mode « contact-intermittent » (tapping) et en utilisant différents types de pointes AFM portés par des leviers ayant des constantes de raideur variées.

Finalement, l'immobilisation par traitement d'une lame de verre à la gélatine [4] a été retenue comme étant la mieux adaptée aux cyanobactéries étudiées. Le type de gélatine à utiliser pour le revêtement de la lame de verre est important, les gélatines disponibles sur le marché ont des origines diverses (poissons, vertébrés...), l'évaluation du type de gélatine adapté à l'immobilisation d'objets biologiques a été faite dans de nombreux travaux précédents, et il s'est avéré que les plus efficaces étaient les gélatines porcines. La méthode d'immobilisation à la gélatine a d'abord été utilisée en suivant scrupuleusement ce qui était décrit dans le protocole de Docktycz *et al.*, 2003 [4]. Ce protocole appliqué, comme telle, nous a permis d'obtenir des résultats meilleurs à tous les autres protocoles d'immobilisation testés, quand il s'agit d'étude à l'air (figure 53).

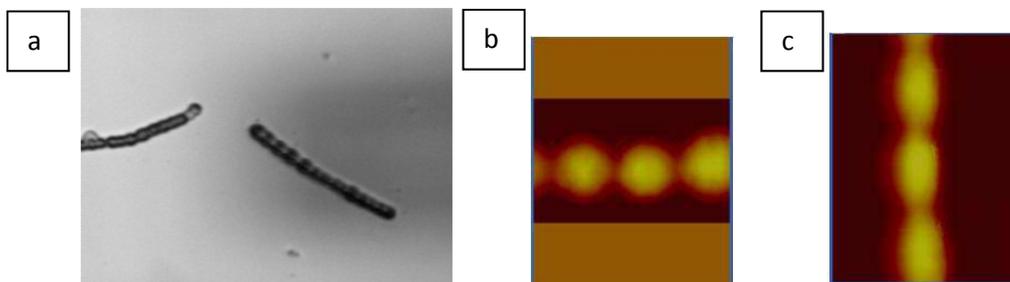


Figure 53 : Image optique (a) et images AFM de hauteur (b, c) de cyanobactéries immobilisées sur lame traitée à la gélatine (à l'air). Largeur de l'image AFM : 15 μ m ; hauteur, échelle de couleur : 3 μ m.

Ces images AFM ont été acquises à l'air, avec une amplitude d'oscillations d'environ 50nm. La pointe utilisée est une pointe EFM (PPP-EFM, PontProbe Plus Electrostatic Force Microscopy, voir la partie « Matériel et Méthodes » pour plus de détails.

Ensuite, l'imagerie AFM a été réalisée en milieu liquide, dans de l'eau ultra pure, en utilisant la même pointe EFM en mode tapping, avec un angle de scan de 340° (figure 54).

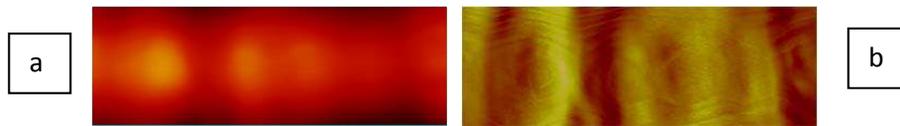


Figure 54 : Images AFM de cyanobactéries immobilisées sur lame de verre traitée à la gélatine (en milieu liquide). Largeur des images : 25μm : (a) : hauteur, échelle de couleur : 4μm (b) : amplitude/signal d'erreur.

Les images AFM sont prises avec un scan size de 25 μm, scan rate 0.350 Hz,. Sur ces images, réalisées en milieu liquide, les bactéries restent immobilisées et ne sont pas déplacées par l'effet de scan de la pointe, on arrive à distinguer les cellules constituant les cyanobactéries sur l'image AFM obtenue, contrairement à tout ce qui a été obtenu jusque-là (figure 52). Cependant, les informations topographiques ne sont pas satisfaisantes, car un film recouvre les cellules de cyanobactéries, empêchant des mesures topographiques précises d'être déduites.

Aussi, différentes modifications ont été apportées aux essais qui consistaient à reproduire ce qui était décrit dans les travaux [4] (voir partie « matériel & méthodes) pour l'adapter à notre échantillon bactérien, jusqu'à l'obtention de protocole optimal. Une de ces modifications au protocole initial consistait à **mélanger les bactéries avec la gélatine (i)** dissoute dans l'eau ultra pure et de déposer le tout directement sur la lame de verre. Tout d'abord, les différents échantillons ont été observés, après leur préparation, dans un état humide (sans les avoir laissé sécher après la préparation pour être considérés comme « secs » et sans place une goutte de liquide entre l'échantillon et la tête AFM pour être considérés comme « en milieu liquide ») (Figure 55).

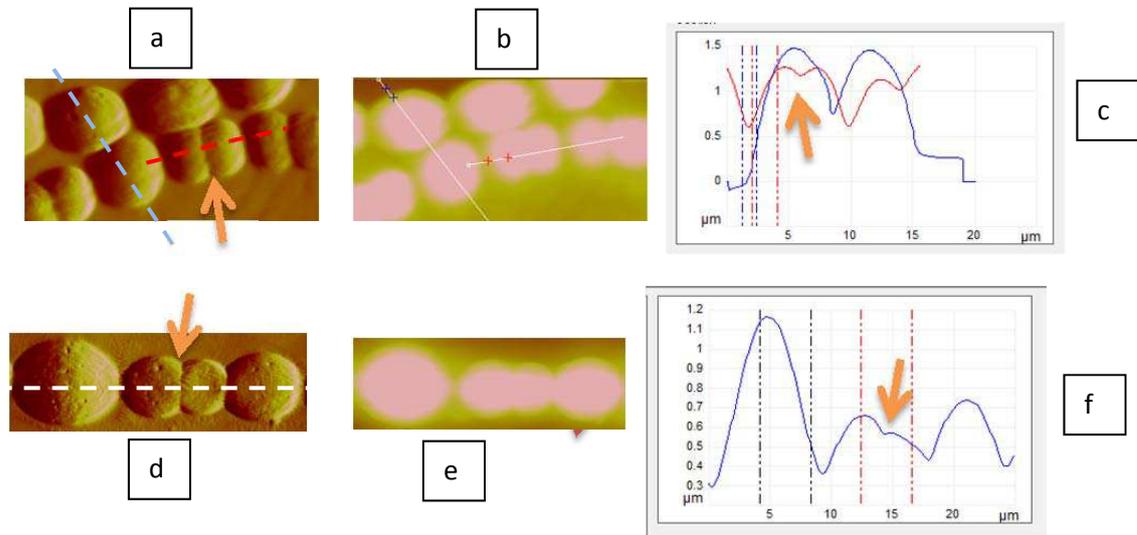


Figure 55 : Imagerie AFM tapping de cyanobactéries et profils de hauteur en milieu humide après immobilisation. (a-b) : largeur des images : 30µm : (a) : amplitude/signal d'erreur ; (b) : hauteur, échelle de couleur : 2µm. (c) profils de hauteur suivant les lignes bleue et rouge de la figure 55.a (d-e) : largeur des images : 25µm : (d) : amplitude/signal d'erreur ; (e) : hauteur, échelle de couleur : 2µm. (f) profil de hauteur suivant la ligne blanche de la figure 55.d

L'imagerie s'est déroulée avec un scan angle de 35°, amplitude d'oscillations en mode tapping : 30nm. Le levier, portant la pointe AFM utilisée, avait une raideur de 2 N/m. Cette méthode a permis de bien immobiliser les bactéries et d'obtenir tout d'abord en milieu humide, sans addition de liquide, des images AFM de cyanobactéries. Ainsi, on distingue nettement les cellules composant la chaîne de cellules bactériennes de cyanobactéries (figure 55). On remarque sur les images, des cellules de plus petite taille, 3.5 µm de largeur, que la majorité des autres cellules à proximité, qui font 7 µm de largeur : elles possèdent un sillon en leur centre différent de la forme régulière et arrondie de la paroi cellulaire. Ce sillon pourrait représenter le sillon de division d'une cellule mère en deux cellules filles de même tailles. En effet, la division cellulaire chez les cyanobactéries se fait par une division cellulaire symétrique (ou fission binaire symétrique) [5], et ce qu'on observe sur ces images AFM pourrait correspondre au moment où deux cellules se différencient d'une cellule mère. Ces phénomènes sont très intéressants à observer, et l'AFM est un outil adapté pour y parvenir puisque peu invasif vis-à-vis des objets biologiques à observer.

A la suite de l'observation de ces échantillons dans un état humide, des essais ont été conduits afin d'observer les cyanobactéries en milieu liquide (avec injection de quelques gouttes de milieu liquide avec une micropipette).

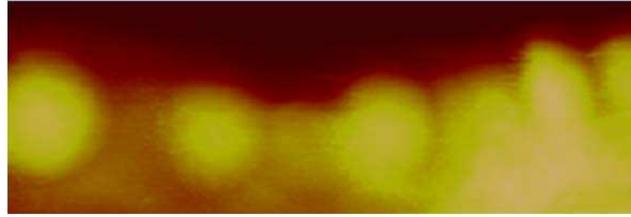


Figure 56 : Image AFM de hauteur de cyanobactéries en milieu liquide (eau UP) après immobilisation par mélange de la suspension bactérienne à la gélatine et dépôt en une seule fois sur lame de verre nue. largeur de l'image : 30 μ m ; hauteur, échelle de couleur : 3 μ m

Ces images AFM (figure 56) ont été obtenues en mode contact, avec une pointe en silicium recouverte de carbure de tungstène (W2C) ayant une constante de raideur de 0.3 N/m, ces images ont été prises avec un angle de scan de 155° et une force d'appui de 20nN. On y voit clairement les cellules composant la chaîne de cyanobactéries, mais encore avec des mesures topographiques imprécises et des bordures de cellules difficilement distinguables.

Une autre modification a été apportée au protocole initial [4], elle consiste à **dissoudre la gélatine dans le milieu de culture BG 11(ii)** (au lieu de l'eau ultrapure) et d'utiliser ce dernier comme milieu liquide par la suite pendant l'imagerie AFM.

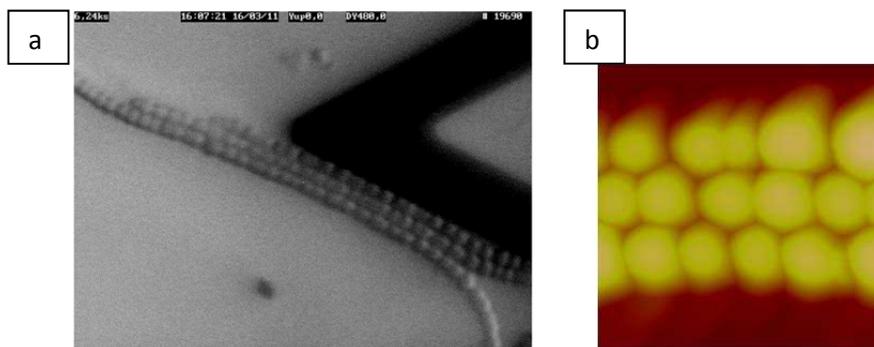


Figure 57 : Imagerie AFM de cyanobactéries en milieu liquide (milieu de culture BG 11) après immobilisation sur lame de verre couverte de gélatine diluée dans le BG11. (a) : image optique, (b) : image AFM de hauteur ; échelle de couleur : 3 μ m.

Cette image (figure 57-b) a été obtenue en utilisant un levier triangulaire, dnp, ayant une constante de raideur de 0.06 N/m. L'imagerie est conduite en mode contact avec un « Scan size » de 20 μ m, scan rate 0.4 Hz. Ici on distingue bien les cellules constituant les chainettes de cyanobactéries, qui est en accord à ce qui est observé en optique (figure 57-a) représentant 3 chainettes de cyanobactéries côte à côte. Les mesures AFM montrent des cellules de largeur 5 μ m et de hauteur de 1-1.5 μ m.

Enfin, une dernière modification a été apportée au protocole initial [4], elle consiste à **dissoudre de l'agar** (au lieu de la gélatine) **dans le milieu de culture BG 11 (iii)** (au lieu de l'eau ultrapure) et d'utiliser ce dernier comme milieu liquide par la suite pendant l'imagerie AFM. Cette méthode est, de loin, celle qui a donné les meilleurs résultats d'imagerie (figure 58).

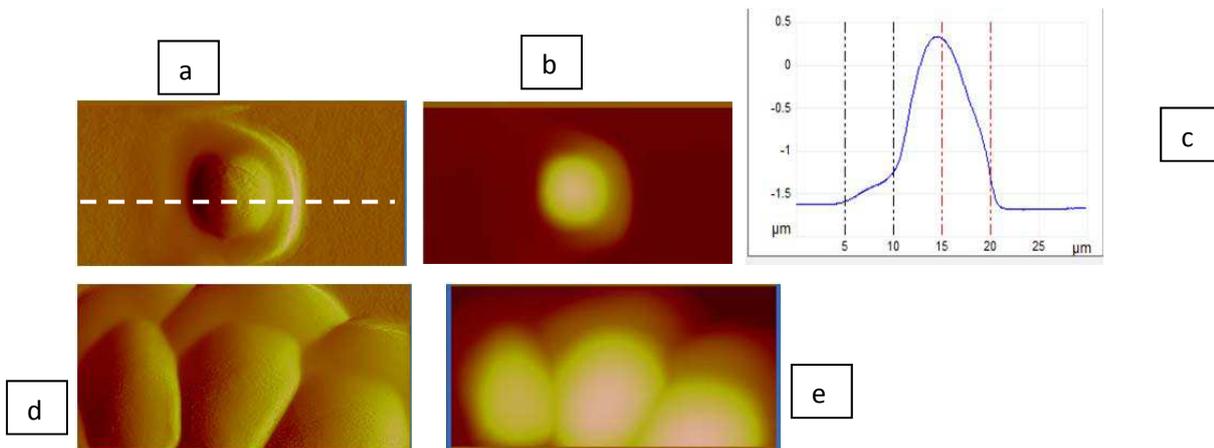


Figure 58 : Imagerie AFM de cyanobactéries en milieu liquide (milieu de culture BG 11) après immobilisation sur lame de verre couverte d'agar dilué dans le BG11. (a-b) : largeur des images : 30 μm : (a) : signal d'erreur ; (b) : hauteur, échelle de couleur : 6 μm . (c) profil de hauteur suivant la ligne blanche de la figure 58.a. (d-e) : largeur des images : 20 μm : (d) : amplitude/signal d'erreur ; (e) : hauteur, échelle de couleur : 5 μm .

Ces images ont été acquises en mode contact, en utilisant une pointe pyramidale portée par un levier ayant une constante de raideur de 0.06 N/m. L'imagerie a été conduite avec succès, sur des cyanobactéries ainsi immobilisées, en milieu liquide BG11. On distingue, sur l'une de ces images (figure 58.a) une cellule bactérienne unique ayant un diamètre de 10 μm et une hauteur de 2 μm .

Ainsi, nous avons pu observer que l'étape d'immobilisation, à la gélatine ou à l'agar, adaptée à notre type de bactéries permettait à la pointe AFM de les scanner sans les déplacer et provoquer de rupture de la chaînette ou son écartement sous le mouvement de la pointe AFM. Le revêtement de la surface de la lame de verre, a permis aux bactéries chargées négativement [6] d'être immobilisées sur la surface et imagées dans le liquide par AFM. Cette immobilisation est très probablement due à l'interaction électrostatique entre les bactéries chargées négativement et la gélatine ou l'agar, qui sont eux chargés positivement [7].

1.3.2. Limites et contraintes

La méthode d'immobilisation par la gélatine ou encore par l'agar, modifiée et adaptée à nos besoins, nous a permis de pouvoir imager des bactéries (cyanobactéries). Nous avons pu, grâce à une bonne qualité d'image et de mesures topographique, observer par cet outil AFM des phénomènes de grande importance (mort cellulaire, division cellulaire et la présence de pores de jonction reliant les cellules bactériennes entre elles). Pour pouvoir réaliser l'immobilisation bactérienne via l'utilisation des gels de gélatine, il est nécessaire de contrôler la nature des constituants chimiques du liquide dans lequel les bactéries sont suspendues, le temps d'incubation de la bactérie, les caractéristiques physiques de la gélatine, de la souche bactérienne et du milieu dans lequel les bactéries sont imagées. Globalement, l'utilisation de gélatine et agar se trouvent être applicables pour l'imagerie des cellules microbiennes.

Cependant, les bactéries ainsi imagées, subissent des contraintes du fait de leur immobilisation. En effet, elles sont mécaniquement « coincées », et on n'est pas en capacité de voir leur comportement « réel ». On est loin de ce qui se produit dans leur environnement naturel, par exemple on passe à côté de phénomènes tels que la mobilité.

De plus, l'introduction de la gélatine ou de l'agar, apporte des perturbations chimiques avec des impacts sur la texture de l'enveloppe bactérienne, le métabolisme de la bactérie, les propriétés topographiques mesurées et le signal électrochimique que nous cherchons à mesurer risquent d'en être perturbés. Aussi, ces substances utilisées pour l'immobilisation, gélatine ou agar, contaminent la pointe AFM qui scanne l'échantillon : elles se déposent petit à petit au cours de l'imagerie sur la pointe ou le levier générant des artefacts sur les images AFM obtenues.

C'est dans ce contexte que nous avons lancé des études pour nous passer de ces étapes d'immobilisation. Ceci a coïncidé avec l'installation d'un matériel performant permettant de mieux travailler par AFM en milieu liquide.

Section 2 : Etude AFM en milieu liquide de bactéries sans immobilisation

2.1. Imagerie AFM en milieu liquide sans immobilisation

A cause de tous les aspects négatifs de l'imagerie AFM en milieu liquide quand elle est précédée d'une étape d'immobilisation des bactéries, et grâce à l'acquisition d'un nouveau microscope Nanowizard 3 et un mode d'imagerie de type spectroscopie de force (le mode QI –Quantitative Imaging-). Nous nous sommes lancés dans des essais pour pouvoir imager ces bactéries en milieu liquide en nous affranchissant de cette étape décrite jusque-là comme inévitable dans toute imagerie AFM en milieu liquide d'un objet biologique, encore plus quand il s'agit de cellules bactériennes entières.

2.1.1. Cyanobactéries

Les premiers essais ont été effectués avec les cyanobactéries comme bactéries modèles, souche *Anabaenopsis circularis* PCC 6720, plusieurs essais ont été nécessaires, pour trouver le protocole de préparation de l'échantillon le plus simple et le plus pratique à mettre au point, permettant d'avoir un échantillon qui se prête à l'imagerie AFM en liquide. Le protocole retenu ainsi que les conditions d'imagerie sont décrits dans la partie « matériel & méthodes ».

Les conditions typiques d'imagerie sont les suivantes : une courbe d'approche-retrait (un pixel) prend 4ms pour une excursion verticale de 500nm. Les images sont, sauf mention expresse, de [512 pixels]². La force maximale est de 5nN. La raideur moyenne d'une cellule est de l'ordre de 0.1N/m. Un exemple typique de courbe d'approche-retrait figure sur la figure 59.

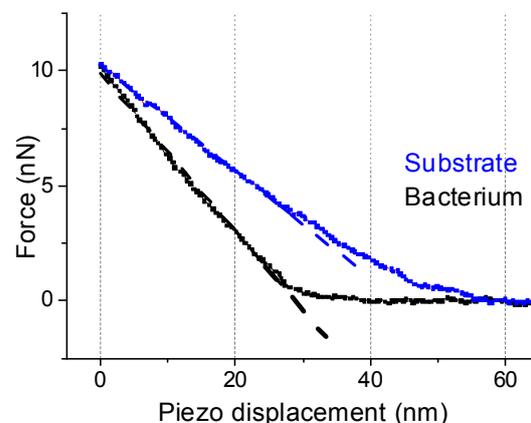


Figure 59 : Courbes typiques d'approche-retrait

La combinaison de cette préparation de l'échantillon, et du choix des paramètres d'imagerie, nous a permis après tous les essais de perfectionnement, d'obtenir d'excellentes images AFM de ces cyanobactéries dans leur milieu de culture BG 11, sans recours à une technique d'immobilisation (figure 60).

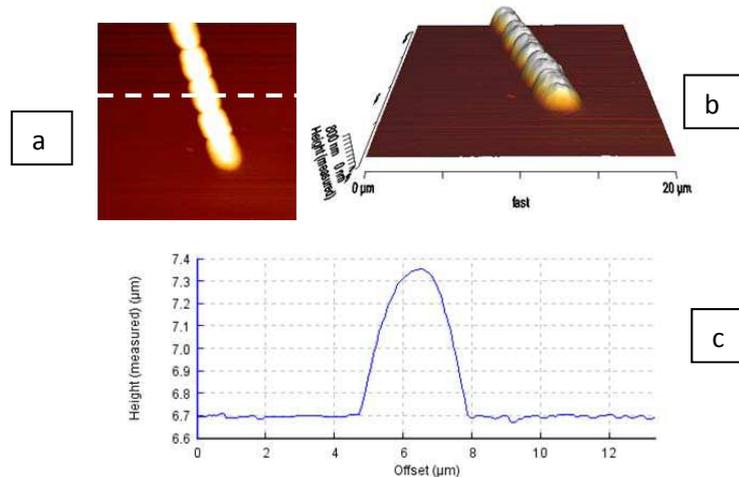


Figure 60 : Imagerie AFM de cyanobactéries en milieu liquide BG11, sans protocole d'immobilisation. (a-b) : largeur des images : 20μm : (a) : image 2D de hauteur ; (b) : image 3D de hauteur, échelle de couleur : 3μm. (c) profil de hauteur suivant la ligne blanche de la figure 60.a

Malgré l'absence de recours à une technique d'immobilisation, l'imagerie en milieu liquide nous a permis d'observer nettement les cyanobactéries, et d'obtenir des images topographiques où on distingue les différentes cellules composant la chaîne de cellules, avec 5μm de largeur chacun et une hauteur de 650 nm. Nous avons réussi à prendre plusieurs autres images dans les mêmes conditions (quelques exemples sont présentés dans la figure 61). Ces images sont de grande qualité et sont à la hauteur de ce qui est disponible dans la littérature scientifique s'agissant de bactéries en immersion dans un milieu liquide (500μL). Nous disposons ainsi d'un protocole parfaitement maîtrisé, sans recours à des techniques d'immobilisation, permettant d'observer les cyanobactéries dans leur milieu de culture dans leurs conditions physiologiques.

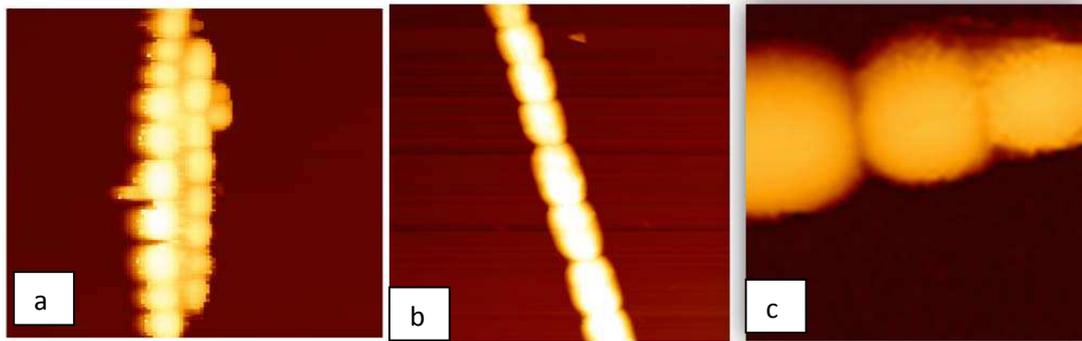


Figure 61 : Exemples d'images AFM de hauteur de cyanobactéries en milieu liquide, réalisées sans recours à une technique d'immobilisation : largeur de balayage : (a) 25 μm ; (b) 20 μm , (c) 10 μm . Hauteur moyenne des bactéries : 2 μm

Ce grand pas réalisé nous a permis de nous affranchir des limites imposées par l'immobilisation et d'être plus proches de l'état physiologique naturel des bactéries afin de les observer et mesurer leurs caractéristiques réelles. Les observations réalisées sur les cyanobactéries ont été approfondies et ont conduit à une étude complète des propriétés topographiques et mécaniques de ces dernières, ils seront présentés dans une partie qui leur est consacrée, intitulée « Etude topographique et mécanique par AFM sur les cyanobactéries » sous forme de publication scientifique.

2.1.2. *Rhodococcus wratislaviensis*

Une fois l'imagerie AFM en liquide réalisée et mise au point sur l'échantillon modèle, cyanobactéries, s'est posé la question de la reproductibilité de la méthode et son application à d'autres types de bactéries. En effet, si ça ne fonctionne que pour ce type de bactéries, ou encore que celles appartenant au groupe des bactéries à Gram négatif, ça limiterait considérablement son champ d'application et son intérêt, et surtout ne pourra pas être appliquée dans le cadre de nos travaux pour le projet ANR BioPHY.

Nous nous sommes donc proposé de l'essayer sur les bactéries d'intérêt de ce projet, à savoir les bactéries utilisées dans la biodépollution des sols contaminés par les hydrocarbures, ayant la capacité de les dégrader, la bactérie *Rhodococcus wratislaviensis*. Le prélèvement des cellules bactériennes, préparation de l'échantillon sur la lame ITO et l'observation par AFM sont réalisés selon le même protocole décrit pour les cyanobactéries, tout en utilisant le milieu de culture des *Rhodococcus wratislaviensis*, le milieu MM, dont la composition est détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

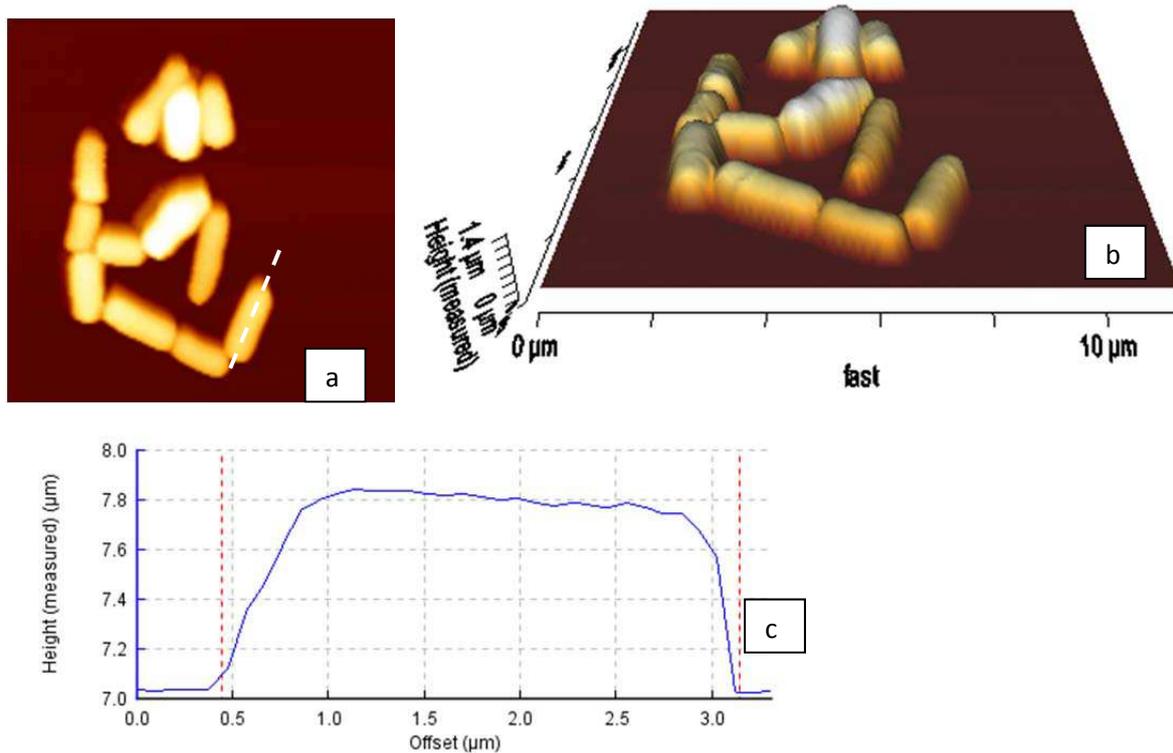


Figure 62 : *Rhodococcus wratislaviensis* imagées par AFM en milieu liquide (MM) sans recours à une étape d'immobilisation au préalable. (a-b) : largeur des images : 12μm : (a) : image 2D de hauteur ; (b) : image 3D de hauteur, échelle de couleur : 2μm. (c) profil de hauteur suivant la ligne blanche de la figure 62.a

Nous avons ainsi, réussi à imager ces bactéries (figure 62), de la même manière que les cyanobactéries. On y voit les cellules bactériennes organisées côte à côte, se regroupant en 3 à 6 cellules, avec des dimensions plus ou moins variables, avec une longueur moyenne de 2.7 μm et une hauteur de 800 nm. Plusieurs essais ont été réalisés sur ces bactéries, nous avons ainsi réussi à obtenir de nombreuses images topographiques, en voici d'autres exemples (figure 63).

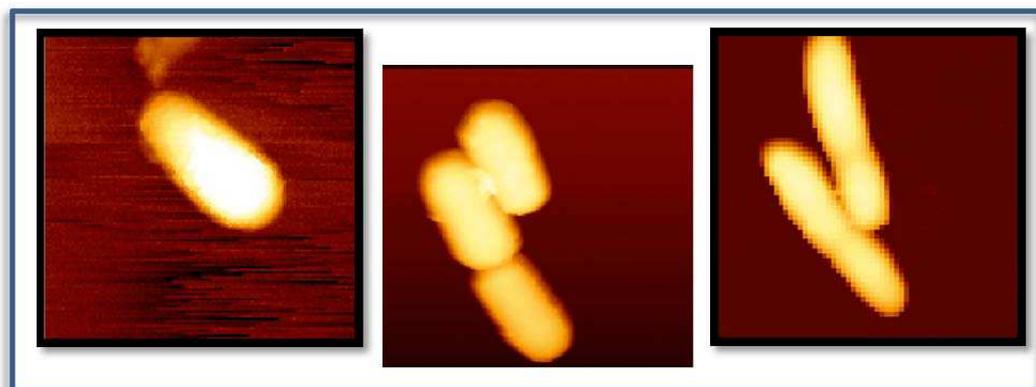


Figure 63 : *Rhodococcus wratislaviensis* imagées par AFM en milieu liquide (MM) sans recours à une étape d'immobilisation préalable. Largeur des images : 5μm ; échelle de hauteur : 2 μm

Les images AFM réalisées sur ces bactéries *Rhodococcus wratislaviensis*, montrent des cellules de 1.1 μm de largeur et de 800 nm de hauteur. Au cours de ces imageries, nous avons observé des liens entre certaines cellules sur les images AFM (figure 64).

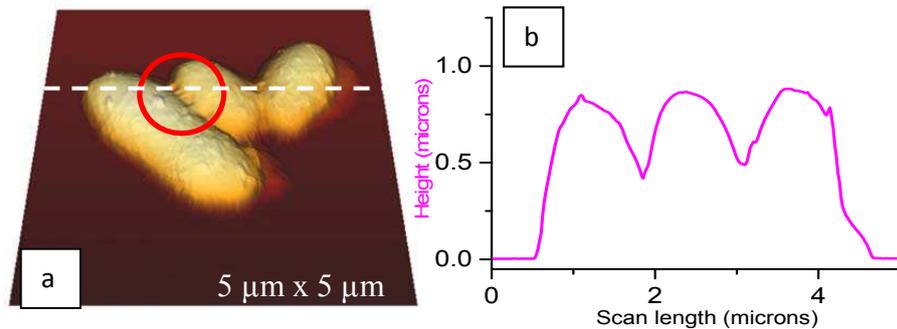


Figure 64 : a- Image AFM en liquide de *rhodococcus wratislaviensis*, où on voit des liens reliant les cellules ; b- profil de hauteur des bactéries imagées le long de la ligne blanche de l'image (a).

Nous avons alors essayé d'imager ces liens probablement très difficiles à imager par AFM liquide. Et au bout de quelques essais nous sommes parvenus, à imager ces « ponts » reliant les cellules entre elles (figure 65).

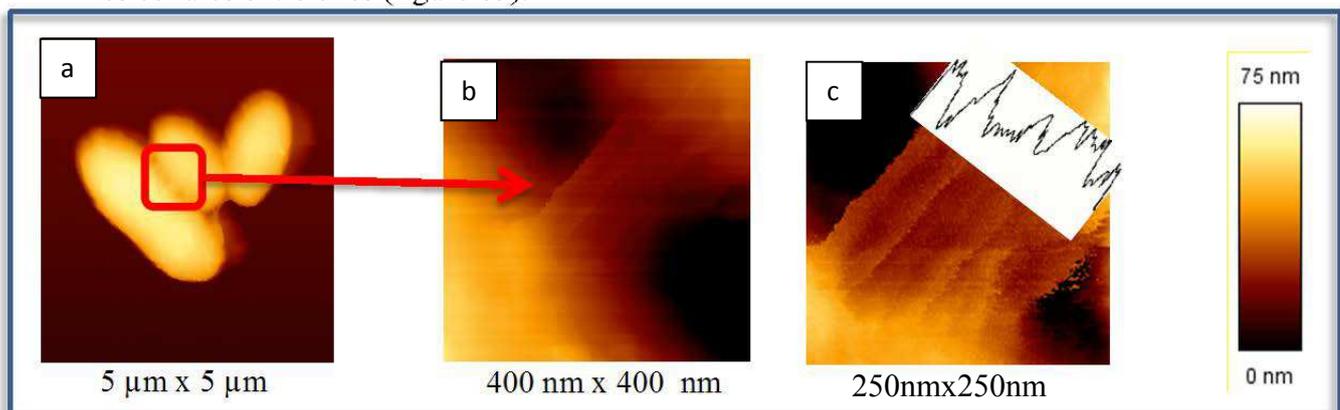


Figure 65 : a,b : Liens entre cellules de *rhodococcus wratislaviensis* imagés par AFM en milieu liquide ; c : agrandissement numérique de l'image centrale b .

Ces ponts intercellulaires, observés chez *Rhodococcus wratislaviensis*, se présentent sous forme de filaments d'environ 200 nm de longueur. Ces connexions sont fréquentes et ont été observées de nombreuses fois comme le montrent les images qui suivent (figure 66).



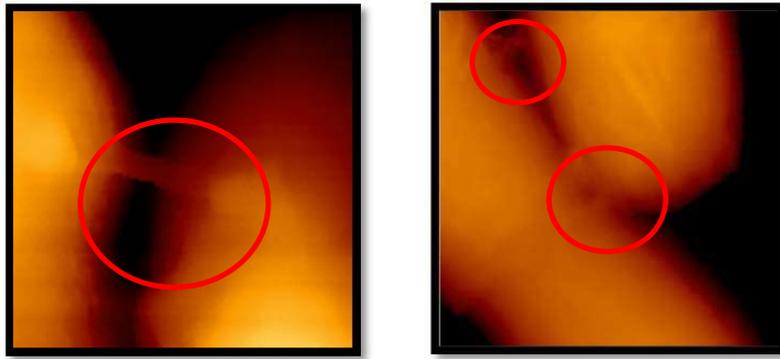


Figure 66 : Exemple de liens entre cellules de *Rhodococcus wratislaviensis* imagés par AFM en milieu liquide.
Largeur typique de l'image : 500nm

A notre connaissance de pareils liens entre cellules n'avaient pas encore été imagés par AFM en milieu liquide. IL faut bien savoir qu'il s'agit là d'une image AFM différente à chaque fois (et non de simple zoom ou autre traitement numérique), avec un repositionnement de la pointe AFM, un scan qui balaye ce lien. Certaines de ces images ont été prises en double ou en triple exemplaire, et le lien a résisté au scan par la pointe. Que représentent ces « liens » ou ces « ponts » intercellulaires ? Ces liens peuvent nous rappeler des images prises par microscopie électronique à transmission à haute résolution « HR-SEM » (High Resolution Scanning Electron Microscope) de ce qui a été appelé « nanotubes intercellulaires » ([8], figure 67).

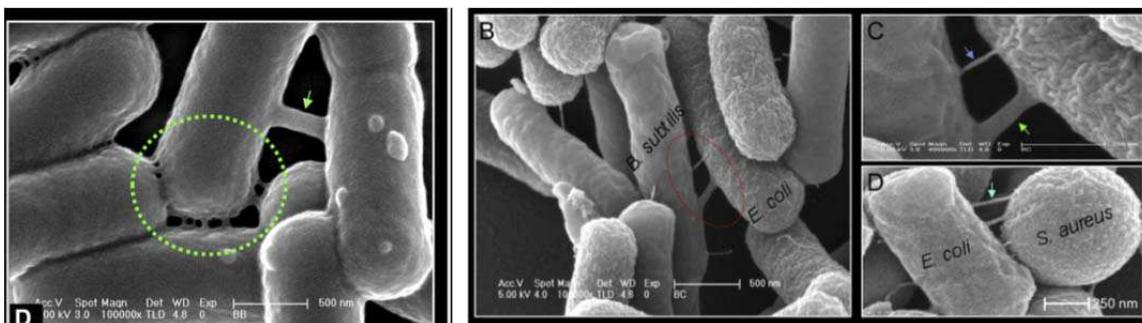


Figure 67 : Nanotubes intercellulaires reliant des cellules de *Bacillus subtilis* (figures extraites de l'article [8]).

Des nanotubes ont déjà été observés chez les bactéries[9], [10], mais avec pour rôle le transfert d'électrons et l'établissement de connexions électriques entre les bactéries. Le plus de cette étude, et son fort impact, repose sur la découverte d'un nouveau rôle de transfert de nutriments via ces nanotubes. En effet, cette étude rend compte d'un nouveau type de transfert de molécules entre cellules bactériennes, ce transfert via des structures en nanotubes avaient déjà été observées dans des cellules végétales ou plus récemment chez des cellules des mammifères, mais jamais détectées chez les bactéries. Jusque-là, l'échange de molécules entre cellules bactériennes était supposé être indirect, par la sécrétion et diffusion de

substances (chimiques, facteurs de signalisation, ADN, plasmides...) dans le milieu. Or, cette étude montre, pour la première fois, qu'un transfert direct à travers des tuyaux microscopiques entre cellules bactériennes existe également. Il permet même une communication intra spécifique et interspécifique (*Bacillus subtilis*/*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*/*E. Coli.*) permettant de tisser des connexions avec d'autres espèces, ce qui pourrait apporter une réponse à certaines questions qui restent en suspens (concernant les consortiums bactériens, la résistance aux antibiotiques en absence de matériel génétique adapté, la survie dans un biofilm...).

D'où l'intérêt des images AFM que nous avons effectué de ces liens intercellulaires, qui viennent confirmer ces résultats, d'autant plus que cette étude mentionne des liens intercellulaires de quelques centaines de nanomètres, ce qui correspond aux valeurs qu'on obtient par nos mesures AFM (de l'ordre de 200 nm). On peut mentionner ici, qu'il existe une étude récente qui laisse à penser qu'il peut y avoir des liaisons par nanofils plus grands, de plusieurs microns [11], ces liens n'ont pas été imagés, lors de nos essais, par AFM en milieu liquide chez *Rhodococcus wratislaviensis*.

Il faut savoir aussi que l'observation par HR-SEM, décrite dans ces travaux [8], n'a été possible qu'après une préparation de l'échantillon bactérien consistant en un protocole long, compliqué et surtout très invasif pour les cellules étudiées. Les bactéries subissent une déshydratation, des lavages à l'éthanol, une fixation par l'utilisation de métaux lourds. L'ensemble de ces étapes implique inévitablement la mort des cellules à observer. L'observation de ces liens sur des cellules vivantes dans leur milieu physiologique naturel telle qu'elle peut être effectuée par notre méthode AFM ouvre donc le champ à des études pertinentes comme leur caractérisation topographique et mécanique, ainsi que la caractérisation par mesures électrochimiques locales des échanges de substances ou signaux électriques qui se font via ces nanotubes. En effet, sur les images AFM de ces liens intercellulaires que nous avons réalisés, les bactéries *Rhodococcus wratislaviensis* n'ont subi aucun traitement, et sont en liquide dans leur milieu de culture (MM) dans un état non perturbé ni mécaniquement ni chimiquement.

2.1.3. *Lactococcus lactis*

Après avoir étudié les bactéries modèles (cyanobactéries) puis les bactéries dépolluantes d'intérêt du projet ANR (*Rhodococcus wratislaviensis*), nous avons étendus nos essais à d'autres types de bactéries dans le cadre de nouvelles collaborations. Nous avons ainsi

appliqué le protocole sur les bactéries lactiques (*Lactococcus lactis*) cultivées dans le milieu M17, l'observation AFM a été délicate, nous avons alors suivi un protocole consistant à utiliser directement des colonies cultivées sur milieu gélosé (et non de cultures liquides). Ces bactéries avaient déjà été étudiées par microscopie électronique par notre partenaire (J.C. Piard, R. Briandet, UBLO « Unité Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes », INRA, Agro ParisTech, UMR1319 Micalis). Ces études avaient permis de bien observer ces bactéries et révélé la présence de nanofils inter cellulaires (figure 68).

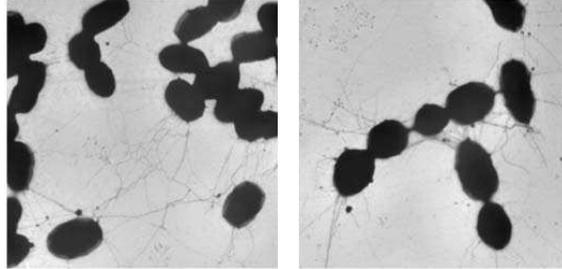


Figure 68 : *Lactococcus lactis* observées par microscopie électronique en transmission. (largeur des images 10 μ m)

Après plusieurs essais nous avons pu imager ces bactéries dans de bonnes conditions en liquide, et là encore sans immobilisation préalable (figure 69°).

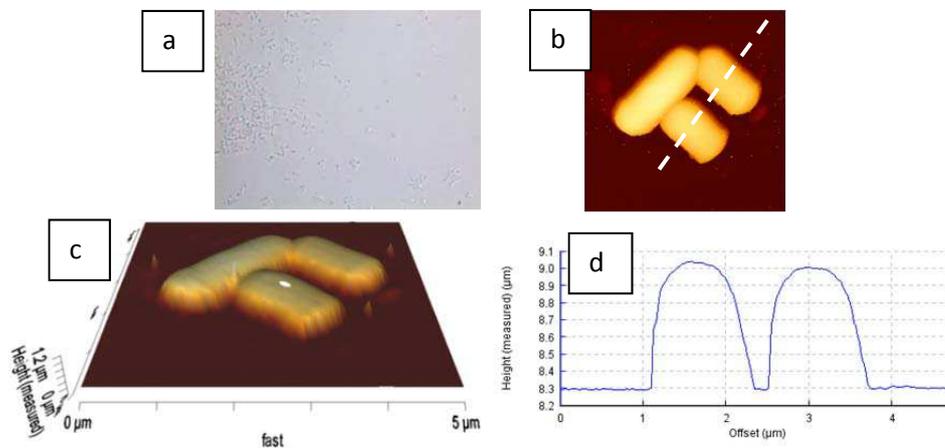


Figure 69: *Lactococcus lactis* observées par microscopie optique (a), par AFM en milieu liquide (b : image topographique 2D, c : image 3D et d : profil de hauteur le long de ligne pointillée blanche).

Ceci montre des cellules mesurant 1.5 à 3 μ m de longueur, avec une largeur de 1 μ m et une hauteur de 700 à 900 nm, et se regroupant en courtes chaînes (2 à 3 cellules). Des images AFM ont été réalisées à proximité des bactéries et semblent montrer des appendices fins filamenteux qui pourraient représenter des pili (figure 70).

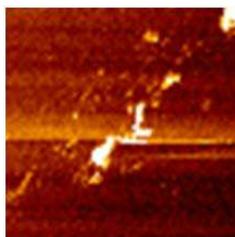


Figure 70 : Image AFM en milieu liquide d'appendices filamenteux à proximité des cellules de *Lactococcus lactis* pouvant représenter des pili.

Des essais supplémentaires sont programmés afin de mieux explorer ces pili par AFM en liquide. En effet, jusqu'à aujourd'hui les pilis n'ont été imagés qu'en atmosphère gazeuse [12], et les observer en liquide pourraient apporter de nombreuses réponses sur leur rôle, leur développement et les facteurs dont ils dépendent.

2.1.4. *Clostridium acetobutylicum* (Cab) et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH)

Deux autres types de bactéries *Clostridium acetobutylicum* ATTC821 (Cab) et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) ont été étudiées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire « Bioénergétique et Ingénierie des Protéines ». UMR 7281, Marseille (E. Lojou, M.-T. Giudici-Orticoni et D. Ranava). L'intérêt pour ces deux types de bactéries est la conception, la construction et l'étude de consortiums microbiens afin d'établir les paramètres régissant les réseaux d'interactions métaboliques avec pour objectif d'optimiser la production d'hydrogène. Nous avons suivi le même protocole décrit pour les cyanobactéries. Après plusieurs essais, réglages et optimisation des paramètres, nous avons réussi à imager le Cab issue de culture (conditions de culture détaillés dans la partie « Matériel et méthodes » (figure 71).

2.1.4.1. *Clostridium acetobutylicum* ATTC821 (Cab)

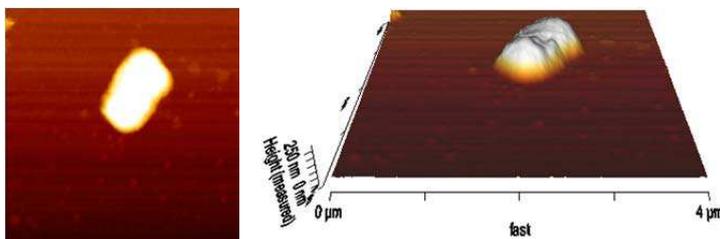


Figure 71 : Cab imagée par AFM en liquide sans immobilisation préalable. Images de hauteur 2d (à gauche) et 3D à droite.

Les images, ainsi acquises, correspondent au résultat de l'observation de ces bactéries par microscopie électronique (figure 72), que ce soit par la forme ou la taille des cellules de 1 μ m de longueur et de 600 nm de largeur.

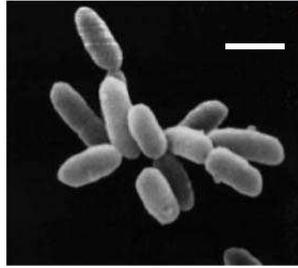


Figure 72 : Image par microscopie électronique de Cab. (trait blanc : 1μm)

2.1.4.2. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH)

Aussi, les bactéries DvH ont été étudiées, non pas directement par prélèvement d'une suspension bactérienne d'une culture liquide, mais d'une lame ITO (stérile) placée au fond de la culture pendant plusieurs jours Ici aussi et après différents tests et optimisations nous sommes parvenus à des résultats positifs en réussissant à les imager par AFM en liquide.

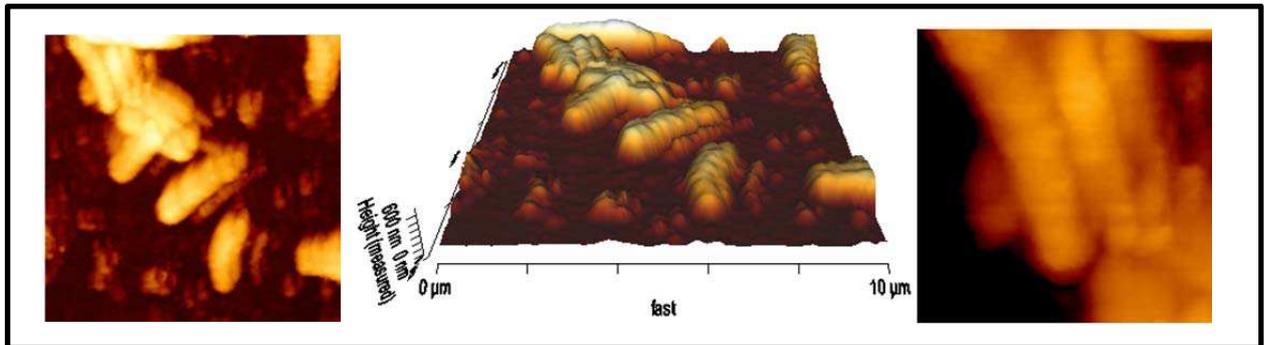


Figure 73 : imagerie AFM en milieu liquide, de biofilm formé par les bactéries DvH.

Il faut noter que sur ces images AFM (figure 73), on observe un léger artefact. En effet, la taille des objets biologiques, imagés par AFM, peut être faussée par leurs surfaces souples qui peuvent se déformer, sous la pression imposée par la pointe, ou encore par la topographie environnante, comme dans notre exemple. En effet, quand les bactéries étudiées sont incluses dans un biofilm, leurs formes sont partiellement déterminées par la forme de la pointe, mais aussi par la topographie environnante. La figure 74, illustre cet effet de distorsion (artefact), où on voit deux particules identiques qui sont imagées différemment parce qu'elles se trouvent dans un environnement différent (l'une sur une surhauteur et l'autre dans un creux).

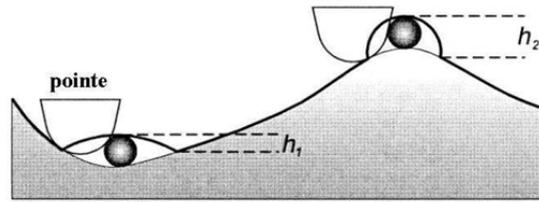


Figure 74 : Schéma indiquant que la taille d'une particule, mesurée par AFM, dépend de la topographie locale. La ligne épaisse indique la hauteur apparente. La particule située dans un creux apparaît plus aplatie que la particule située sur une bosse ($h_1 < h_2$) [13].

Ces images AFM correspondent au résultat de l'observation de ces bactéries par microscopie électronique révélant leur forme caractéristique en virgule (figure 75).

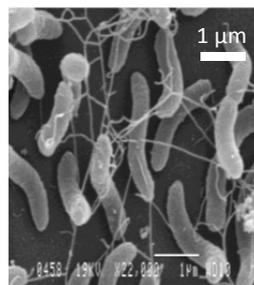


Figure 75 : Image par microscopie électronique de DvH.

2.1.4.3. Coculture Cab-DvH

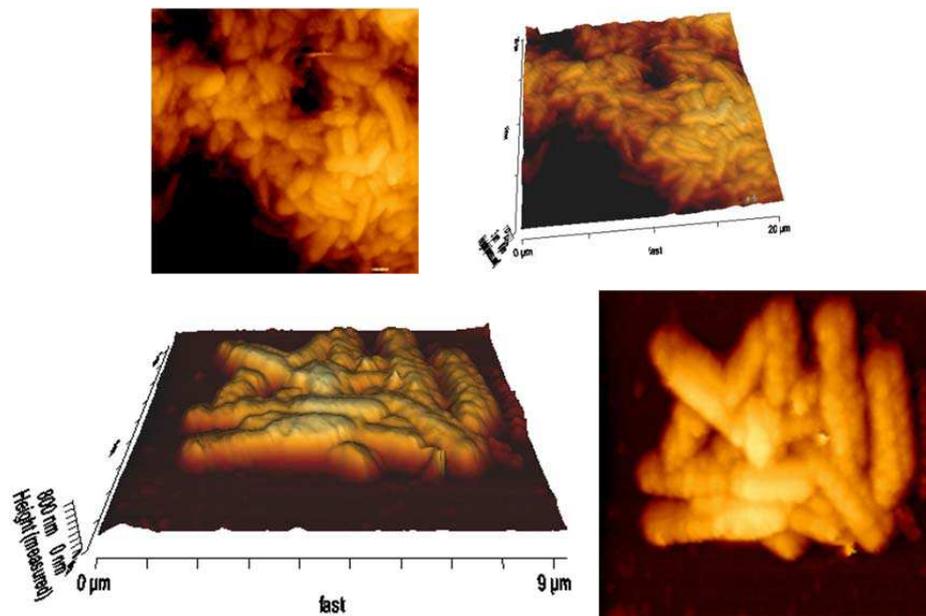


Figure 76 : Imagerie AFM, en milieu liquide, d'une co-culture de Cab –DvH. Images de hauteur : images du haut : largeur 20µm ; images du bas : largeur 9.5µm

L'observation de l'échantillon correspondant à la co-culture de ces deux souches bactériennes (figure 76) a été réalisée. L'échantillon était constitué d'un biofilm assez rugueux et épais,

présentant une hauteur de quelques micromètres, d'où l'effet artefact retrouvé sur ces images AFM également. Malgré cela nous avons pu imager ces échantillons dans des conditions correctes, confirmant que notre méthode d'imagerie et de préparation d'échantillon est applicable à d'autres types de bactéries (Cab, DvH), et permet d'effectuer des mesures AFM sur ce type de co-cultures.

L'ensemble de ces études AFM, ont permis de réaliser des mesures AFM sur les différentes bactéries en milieu liquide, sans faire appel à une méthode d'immobilisation externe et en gardant les cellules dans leur état physiologique naturel. Ainsi, ces mesures en forme d'images QI, apportent des informations précieuses, que ce soit de type topographique (dimensions) ou encore de type mécanique (Module d'Young et pression de turgescences sur ces cellules bactériennes étudiées. Ainsi, ces travaux préliminaires ouvrent la voie aux différentes collaborations engagées (avec l'« Unité Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes » de Paris, ou le laboratoire de « Bioénergétique et Ingénierie des Protéines » de Marseille), pour étudier les différences ou l'évolution de l'état des différentes cellules bactériennes dans différentes conditions expérimentales, conditions physicochimiques, présence de certaines biomolécules, cultures séparées ou en consortium, afin d'en extraire les informations nécessaires à leurs différentes thématiques de recherches, des travaux dans ce sens sont étudiés et leur réalisation prévue à la suite de cette thèse.

2.2. Etude topographique et mécanique par AFM sur les cyanobactéries

2.2.1. Présentation de l'étude

L'affranchissement de protocole d'immobilisation des bactéries avant leur observation par AFM en milieu liquide nous a permis d'observer ces dernières dans leur état physiologique naturel, non contraintes ni chimiquement ni mécaniquement. Ainsi, nous avons observé les cyanobactéries en reptation sur la surface de la lame de verre. En effet, bien que dépourvues de flagelles, certaines espèces de cyanobactéries notamment les *Anabaenopsis circularis* PCC 6720 sont mobiles. Cette mobilité consiste en un mouvement lent de « reptation » linéaire, le mécanisme régissant ce mouvement reste jusqu'à présent inconnu faute de méthodes d'investigation. Ce phénomène est pourtant d'une grande importance car il est impliqué dans la formation des biofilms.

Tout d'abord, nous avons suivi optiquement ce phénomène de reptation au cours du temps, afin de caractériser la vitesse de déplacement des bactéries (par un ensemble de programmes développés). Ensuite, des essais ont été conduits afin d'essayer d'imager par AFM ces bactéries en déplacement. Ce défi a été relevé, avec une rapide acquisition des images AFM, les cyanobactéries ont été imagées en mouvement sous la pointe AFM qui les balayaient.

Nous nous sommes attardés sur l'étude de ce mouvement de reptation, la vitesse de déplacement de ces bactéries a ainsi pu être étudiée par AFM, elle est de l'ordre de 900 $\mu\text{m/h}$. Les études AFM ont permis d'acquérir des données topographiques mais aussi mécaniques : nous avons ainsi pu mesurer le module de Young et la pression de turgescence des deux souches étudiées (*Anabaenopsis circularis* PCC 6720 et *Rhodococcus wratislaviensis*).

Ces données ont révélé la présence de trois grands composants des bactéries imagées : (i) la bactérie elle-même, caractérisée par un module de Young typique de 100 MPa pour *R. Wratislaviensis* et de 20 à 60 MPa pour les cyanobactéries *Anabaenopsis circularis* PCC 6720 (cette valeur augmente avec la vitesse de déplacement de ces dernières). Pour les deux souches étudiées, la pression de turgescence variait de 50 à 300 kPa selon le type de bactérie et la vitesse de glissement (pour *Anabaenopsis circularis* PCC 6720) (ii) aussi, une fine couche de polymères a été mise en évidence et caractérisée avec une grande précision, cette couche est excrétée par la bactérie lors de son mouvement (*Anabaenopsis circularis* PCC 6720) ou afin de favoriser son adhésion à la surface de verre de l'échantillon imagé pour *R. wratislaviensis*, qui est non mobile, son épaisseur est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres chez ces derniers, alors qu'elle est de quelques dizaines de nm pour les *Anabaenopsis circularis* PCC 6720. Nos expériences ont montré que l'épaisseur de cette couche de polymères augmentait avec la vitesse de déplacement des *Anabaenopsis circularis* PCC 6720, renforçant l'hypothèse de Hoiczky et al. [14] selon laquelle le mode de reptation des cyanobactéries, aurait pour origine la propulsion par éjection de substance extracellulaire (iii) une matrice extracellulaire (ECM) chez les *Anabaenopsis circularis* PCC 6720, avec un module de Young de 4 à 15 MPa variant en fonction de la vitesse de déplacement. Cette couche (ECM) n'a pas été détectée chez *R. wratislaviensis*.

Ainsi, une conclusion importante de cette étude est que des données d'une excellente qualité à la fois de hauteur et de rigidité peuvent être obtenues par AFM en milieu liquide sans le recours à une étape d'immobilisation artificielle des bactéries. Cela ouvre de grandes perspectives pour de nouvelles recherches, à l'échelle nanométrique, basées sur la dynamique des cellules vivantes dans leurs conditions physiologiques naturelles. Les résultats de ce

travail ont été publiés dans le journal « Plos One » sous le titre : «In-situ determination of the mechanical properties of gliding or non-motile bacteria by Atomic Force Microscopy under physiological conditions without immobilization.», et sont exposés ci-dessous [15].

2.2.2. Publication « «In-situ determination of the mechanical properties of gliding or non-motile bacteria by Atomic Force Microscopy under physiological conditions without immobilization»»

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

In-Situ Determination of the Mechanical Properties of Gliding or Non-Motile Bacteria by Atomic Force Microscopy under Physiological Conditions without Immobilization

Samia Dhahri¹, Michel Ramonda², Christian Marlière^{1,3*}

1 Géosciences Montpellier, University Montpellier 2, CNRS, Montpellier, France, **2** Centrale de Technologie en Micro et nanoélectronique, Laboratoire de Microscopie en Champ Proche, University Montpellier 2, Montpellier, France, **3** Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, University Paris-Sud, CNRS, Orsay, France

Abstract

We present a study about AFM imaging of living, moving or self-immobilized bacteria in their genuine physiological liquid medium. No external immobilization protocol, neither chemical nor mechanical, was needed. For the first time, the native gliding movements of Gram-negative *Nostoc* cyanobacteria upon the surface, at speeds up to 900 $\mu\text{m/h}$, were studied by AFM. This was possible thanks to an improved combination of a gentle sample preparation process and an AFM procedure based on fast and complete force-distance curves made at every pixel, drastically reducing lateral forces. No limitation in spatial resolution or imaging rate was detected. Gram-positive and non-motile *Rhodococcus wratislaviensis* bacteria were studied as well. From the approach curves, Young modulus and turgor pressure were measured for both strains at different gliding speeds and are ranging from 20 ± 3 to 105 ± 5 MPa and 40 ± 5 to 310 ± 30 kPa depending on the bacterium and the gliding speed. For *Nostoc*, spatially limited zones with higher values of stiffness were observed. The related spatial period is much higher than the mean length of *Nostoc* nodules. This was explained by an inhomogeneous mechanical activation of nodules in the cyanobacterium. We also observed the presence of a soft extra cellular matrix (ECM) around the *Nostoc* bacterium. Both strains left a track of polymeric slime with variable thicknesses. For *Rhodococcus*, it is equal to few hundreds of nanometers, likely to promote its adhesion to the sample. While gliding, the *Nostoc* secretes a slime layer the thickness of which is in the nanometer range and increases with the gliding speed. This result reinforces the hypothesis of a propulsion mechanism based, for *Nostoc* cyanobacteria, on ejection of slime. These results open a large window on new studies of both dynamical phenomena of practical and fundamental interests such as the formation of biofilms and dynamic properties of bacteria in real physiological conditions.

Citation: Dhahri S, Ramonda M, Marlière C (2013) In-Situ Determination of the Mechanical Properties of Gliding or Non-Motile Bacteria by Atomic Force Microscopy under Physiological Conditions without Immobilization. PLoS ONE 8(4): e61663. doi:10.1371/journal.pone.0061663

Editor: Etienne Dague, LAAS-CNRS, France

Received: November 23, 2012; **Accepted:** March 12, 2013; **Published:** April 12, 2013

Copyright: © 2013 Dhahri et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, Paris, France) through the program ECOTECH_2011 (project BIOPHY N°ANR-10-ECOT-014-05). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christian.marliere@u-psud.fr

Introduction

Atomic force microscopy (AFM) is a very powerful tool to get precious information about the nanoscale surface architecture of cells, the localization and interactions of their individual constituents with various internal and external agents. For instance, purified bacterial membranes have been imaged with very high resolution revealing the evolution of the organization of photosynthetic membranes in response to light [1]. Changes of cell surface structure were observed in physiological conditions during the germination of *Aspergillus fumigatus conidia* [2] at a resolution of a few nanometers. The nanomechanical properties of live cells have been mapped quantitatively using high rate dynamic AFM with a resolution in sub-10 nm range [3]. Recently, very high-speed atomic force microscopy with nanometer resolution revealed the action of an antimicrobial peptide on individual *Escherichia coli* cells [4].

One important common aspect of all these reported results is that the employed methods required to immobilize the cells firmly

enough to enable them not to be swept out during the AFM scanning. The claimed aim was to withstand the lateral friction forces exerted by the tip during scanning without denaturing the cell interface and surface. As mentioned in many recent papers and reviews [5–7] that immobilization step has been considered as mandatory. In order to increase the adhesion of microorganisms, such as bacteria, to surfaces for AFM imaging in liquid, many protocols have been proposed. One of the first used methods required the drying of the sample [8], therefore limiting drastically cell viability [9]. Furthermore re-immersion in buffer medium was a challenging step. Many methods based on the use of various chemical ligands between the micro-organisms and the sample have been proposed such as polyphenolic proteins extracted from the marine mussel [10]. Another very common technique consists of pretreating the support with polycations, such as poly-L-lysine [11] or derivatives. However, the active groups used in covalent binding and the reagents used for cross-linking are known to affect cell viability by cross-linking the proteins on the cell surface [12] or

by inducing cell porosity [13]. Mechanical entrapment in aluminum oxide filters [14] or in porous membranes such as isopore polycarbonate membranes [15] were developed to avoid slow poisoning by chemical immobilizing and proved to be effective. Such entrapment methods are mainly suitable for imaging and force measurements on spherical cells. However this technique may impede the monitoring of active processes such as cell division and bacteria may be in a state of mechanical stress far away from their standard living conditions. Furthermore, parameters such as pore size compatibility, depth of pores and confinement effects are difficult to master. Other physical methods based on trapping in soft gels as agar, gelatin layers [16] have been considered but these extracellular structures may lead to artifacts in AFM images through, for example, contamination of the apex of the tip. Recently, a new method has been proposed. It consists in assembling the living cells on specific areas within the patterns of micro-structured, functionalized poly-dimethylsiloxane stamps using convective/capillary deposition [17].

Because of immobilization step, using entrapment in membrane's pores or gluing techniques by means of chemicals, the cells are likely far away from their natural physiological conditions, which is a limiting factor for the biological relevance of such obtained results. Furthermore, by immobilization, one important aspect of many bacteria is overshadowed: Depending on the strain, bacteria may move inside the buffer medium by swimming or along limiting surfaces by gliding. In this last case, bacteria usually form the so-called biofilms [18]: structured, multicellular communities embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) on solid substrates. Such biofilms are of very practical importance as they concern ubiquitous issues as in geophysical field [19] and is prevalent in natural, industrial and hospital settings [20], etc. An important parameter in the formation of biofilms is the mobility of bacteria. Many Gram-negative and Gram-positive bacteria have been shown to possess on their outer surfaces a variety of organelles known as pili, flagella or injectisomes useful for their motility [21–24]. However a large part of bacteria exhibits the ability to be motile along a surface without the aid of these organelles. *Nostocales* belong to this group and contains most of the species of cyanobacteria capable of gliding [25,26]. Gliding is a form of cell movement that does not rely on any obvious external organ or change in cell shape and occurs only in the presence of a solid sample [27,28]. The gliding mechanism itself has been mainly studied using conventional optical microscopy following the evolution of a pre-deposited seedling root on an agar gel. However, due to its gelatinous cell walls, bacteria adhere strongly to the agar gel [28]. Optical observations require the follow-up of the gliding movement during very long times, typically one day or more. The first moments of gliding and consecutively its mechanism are thus unreachable [29]. Different hypotheses about the origin of the gliding in filamentous cyanobacteria have been proposed: it could be powered by a "slime jet" mechanism, in which the cells extrude a gel through pores surrounding each cell septum providing a propulsion force [30–32]. An alternative hypothesis is that the cells use contractive elements that produce undulations running over the surface inside the slime tube like an earthworm [33]. A recent study, performed on immobilized bacteria (in dental wax) and based on the use of static AFM data [34] and scanning electron microscopy, revealed that arrays of parallel fibrils may be involved in the gliding mechanism. Also recent observations were made using new ellipsometric optical microscopy technics on *Myxococcus xanthus* [35]. The authors observed that slime is deposited at constant rate underneath the cell body slime. They suggested that this polymeric layer promotes the adhesion of the bacterium to the

substrate without an effective participation to the motility machinery.

Here we present a study on AFM imaging of living bacteria in their standard (physiological) liquid environment without any external immobilization step. This was feasible thanks to an original method relying on an improved combination of a gentle sample preparation process and an AFM procedure based on fast and complete force-distance curves made at every pixel, drastically reducing lateral forces [36]. Two examples of very different strains are presented. First a non-motile, Gram-positive species (*Rhodococcus wratislaviensis*, IFP 2016, IFP Energies Nouvelles, Rueil-Malmaison, France) [37]. Highly spatially resolved AFM images of this species are obtained. Secondly, a filamentous, Gram-negative *Nostoc* cyanobacterium (*Anabaenopsis circularis*, PCC 6720, Institut Pasteur, Paris, France) well known for its gliding movement on surfaces of glass slides was studied. With this last bacterial strain, we were able to visualize for the first time the bacterium *during* its gliding movement on a glass slide by using AFM at a high acquisition rate (two images per minute and above) without limitation in spatial resolution. Different gliding speeds, from few tens to hundreds of nanometers per second, measured by cross-compared optical microscopy and AFM data, were studied. AFM height and mechanical stiffness data were simultaneously acquired. From these, mechanical parameters, inner turgor pressure and Young modulus, were derived. These results are a direct proof of the low impact of these breakthroughs AFM observations on the native behavior of the bacteria as its living character is verified thanks to its movement.

Results

We successively studied two categories of bacteria: first *Rhodococcus wratislaviensis* [37], a bacterium currently used for degradation of mixtures of hydrocarbons, known to be non-motile, and, second, *Nostoc* bacteria able to glide on solid samples without the help of flagella or pili.

We first report results on *R. wratislaviensis*. Height images were taken in liquid phase (MM medium) by using QJ mode [36] (see Material and Methods section) and are plotted in 2D (figure 1.a) and 3D (figure 1.b) using following parameters: 256 by 256 pixels, scan width 5 microns, acquisition time for one image around 10 minutes. The maximum applied force during the approach of the AFM tip was 6nN. The mean indentation depth in bacterium is around 40 nanometers. In the 3D image very fine topographic details on bacteria membranes such as small protuberances are better evidenced. It should be noted that the AFM image quality in liquid, moreover for non-immobilized bacteria, is unsurpassed [38,39]. The mean height of such bacteria is around 1 micron for a typical width of 1.2 microns. Two height profiles are plotted (figures 1.c and 1.d). In these profiles, a swelling (lateral expansion 450 nm) is clearly visible at the right side of the main part of the bacteria and corresponds to a lower thickness (around 150 nm) than on the central part of the bacterium. The only presence of these swellings at the right side of the bacteria is very unlikely due to an AFM scanning artifact. Indeed a smoothing of the height profile at the edge of the bacterium, due to a spurious convolution effect related to the finite value of semi-top angle of the AFM tip, can be very likely ruled out: such effect would have been preferentially located at lower parts of the bacteria as the cantilever, perpendicular to the horizontal side of the AFM image, is scanning from the top to the bottom. The approach curves giving the variation of the applied force versus the scanner elongation for the bacterium, the right swelling and the glass slide are plotted in figure 2. They revealed typical features for three

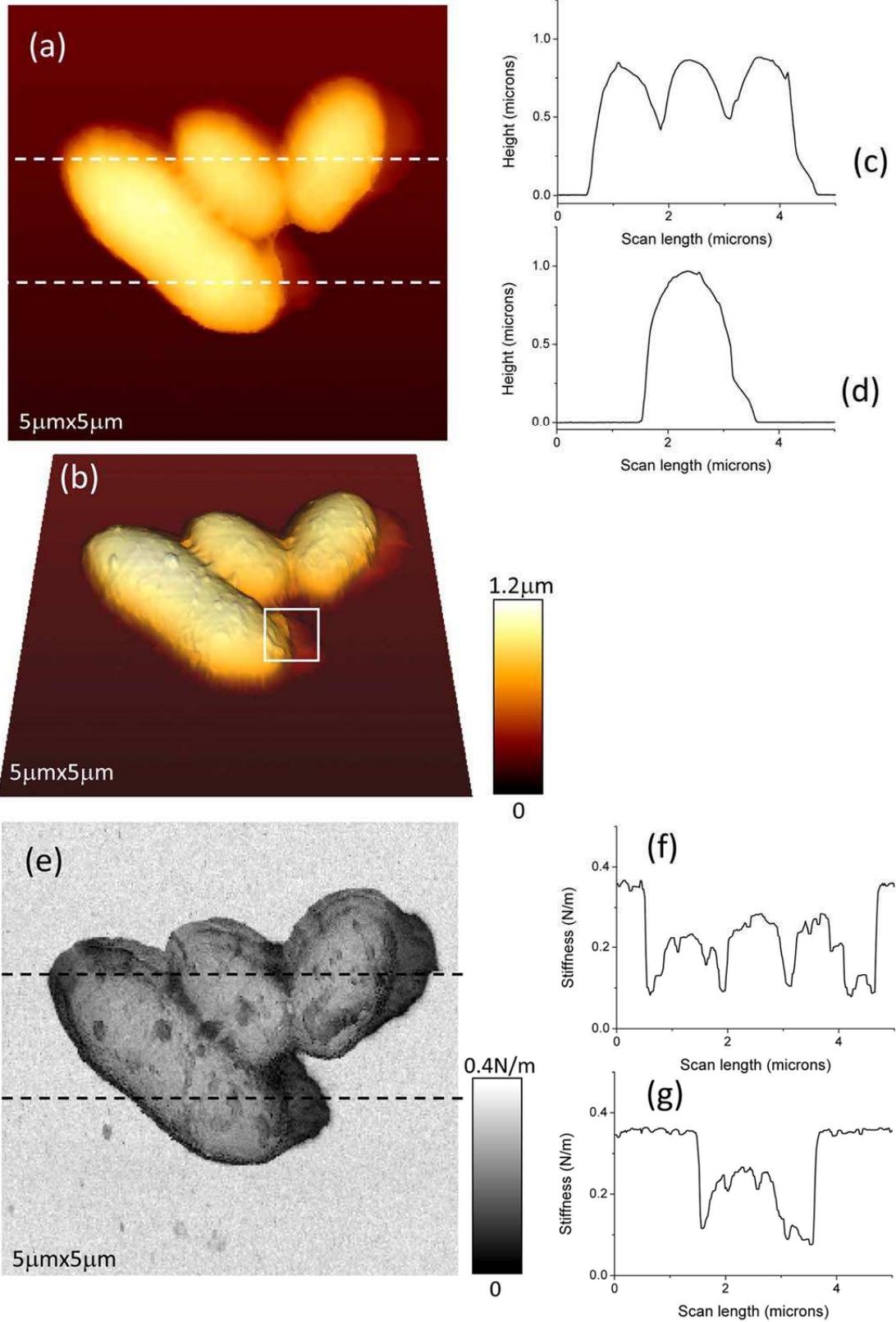


Figure 1. AFM height and stiffness data for *Rhodococcus wratislaviensis*. AFM height (a–b) and stiffness (e) images of *Rhodococcus wratislaviensis* in their physiological (MM) medium. Height (c–d) and stiffness (f–g) profiles along dashed lines in figures (a) or (e), respectively, are plotted.
doi:10.1371/journal.pone.0061663.g001

different components with various stiffnesses: the softest one has a very rounded profile for low force domain and can be related to the bacterium’s right swelling; the stiffest one with a linear behavior concerns the glass substrate; and the intermediate stiffness is characteristics of the bacterium.

The corresponding stiffness image, simultaneously acquired with topographic data, is shown in figure 1.e. The two stiffness profiles along the two scan lines as defined in height data are plotted in figures 1.f and 1.g. It must be pointed out that these values of stiffness are effective ones as they result from the association of two linear springs in series [40], one related the AFM’s cantilever and the other to the bacterium envelope. The “glass slide” level corresponds to a stiffness of 0.35 ± 0.01 N/m, which is the typical stiffness value of the working cantilever. This is very near from the value we obtained by standard determination based on thermal noise [41]: $k = 0.36 \pm 0.01$ N/m. This value is the maximum stiffness we can measure with our AFM system as it works like a mechanical low-pass filter limited by the finite elasticity of the cantilever. This upper level is clearly evidenced by the light gray level in stiffness image. The effective stiffness of the bacterium has an approximate value of 0.23 ± 0.05 N/m. The swellings at the right side of bacteria, as defined above, are characterized by an effective stiffness of around 0.11 ± 0.03 N/m. These three main levels of stiffness are more visible in the histogram plot of the stiffness values (figure 3). Peak number 1 (P1) corresponds to the glass sample (0.35 ± 0.01 N/m), P2 to the bacterium (0.23 ± 0.05 N/m), and P3 to the swelling at the right of bacteria (0.12 ± 0.02 N/m). Please note that these effective stiffness values have been determined by using automatic peak detections (lorentzian shape assumed) through *OriginPro8.5* software (from *OriginLab*). That smaller value for effective stiffness (P3) is related to the presence of a polymeric layer, we will define it as *slime*, mainly located at the right side of the main part of the bacteria as observed in height images (figures 1.a, 1.b). The small protuberances on the membranes of *R. wratislaviensis* as seen in height data

(figure 1.b) correspond to dark grey spots in stiffness images, zones with lower stiffness. We also investigated *R. wratislaviensis* with a higher lateral resolution as it is shown in figure 4 where new data (256×256 pixels; lateral scan size of 1 micron) were taken. Minute details on the membrane of the bacterium and the presence of a slime layer nearby the bacterium as well are clearly evidenced. In the histogram data (Fig. 4.d) of the stiffness image (figure 4.c) three peaks are visible and are positioned at stiffness values very similar to those previously determined: 0.35 ± 0.02 N/m (P3, the glass slide contribution: up/right corner of the image), 0.24 ± 0.05 N/m (P2, bacterium’s membrane) and 0.10 ± 0.02 N/m (P1, slime). These results demonstrate that topographic and mechanical AFM data of high spatial resolution can be acquired by using our experimental protocol and set-up without the introduction of any external immobilizing step. Only the natural adherence of the bacterium on the sample through the slime layer contributes to the feasibility of the acquisition of such AFM data. No parasite sweeping movements of bacterium during the AFM scan were detected. These images are very stable in time as several acquisitions were done during at least two hours without any noticeable changes in conformation.

Thereafter cyanobacteria were studied. By means of optical microscopy we first observed the gliding movement of these filamentous *Nostoc*s along the surface of the solid sample. Figure 5 is a typical example of such motility: the arrows indicate two successive positions of one of the nodule over time. This motility was optically observed regardless of the distance between the AFM cantilever and the substrate: from few microns (figure 5) to zero (AFM tip in contact). A typical curve showing the variation of the position of one of the *Nostoc* nodules (along the horizontal axis, X) is plotted in figure 6.a (tip/substrate distance = $500 \mu\text{m}$). As often noticed [27], forward and backward movements are observed. Same kind of movement for another *Nostoc* is optically observed when the AFM tip scanned the sample: the *Nostoc* displacement along X axis (figure 6.b, solid line) and its related X speed (figure 6.b, left triangles) are reported. The Y position of the AFM cantilever during its scanning movement is plotted in lower parts of figures 6.b and 6.c. The starting time of each AFM image is

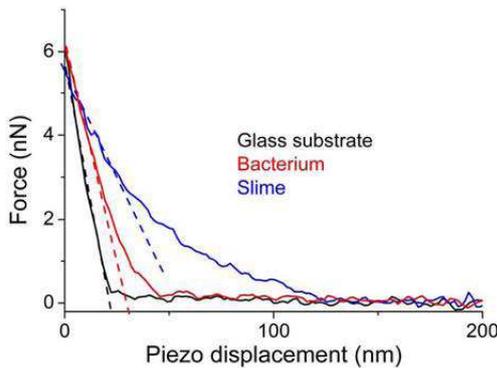


Figure 2. AFM approach curves. AFM approach curves in MM liquid are plotted for the glass substrate (black line), the *Rhodococcus wratislaviensis* bacterium (red line) and its slime (blue line). The raw curves have been shifted along X axis to better view the contrast in slopes at the force setpoint. The dashed lines are an illustration of how the effective stiffnesses are calculated from these approach curves (best linear fit for a length window of 10 nm).
doi:10.1371/journal.pone.0061663.g002

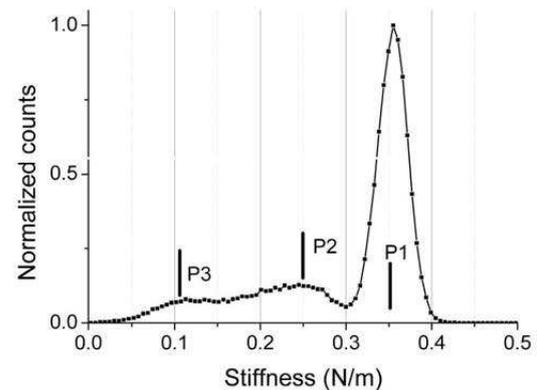


Figure 3. Stiffness histogram for *Rhodococcus wratislaviensis*. Stiffness histogram related to AFM stiffness image (figure 1.e) is shown.
doi:10.1371/journal.pone.0061663.g003

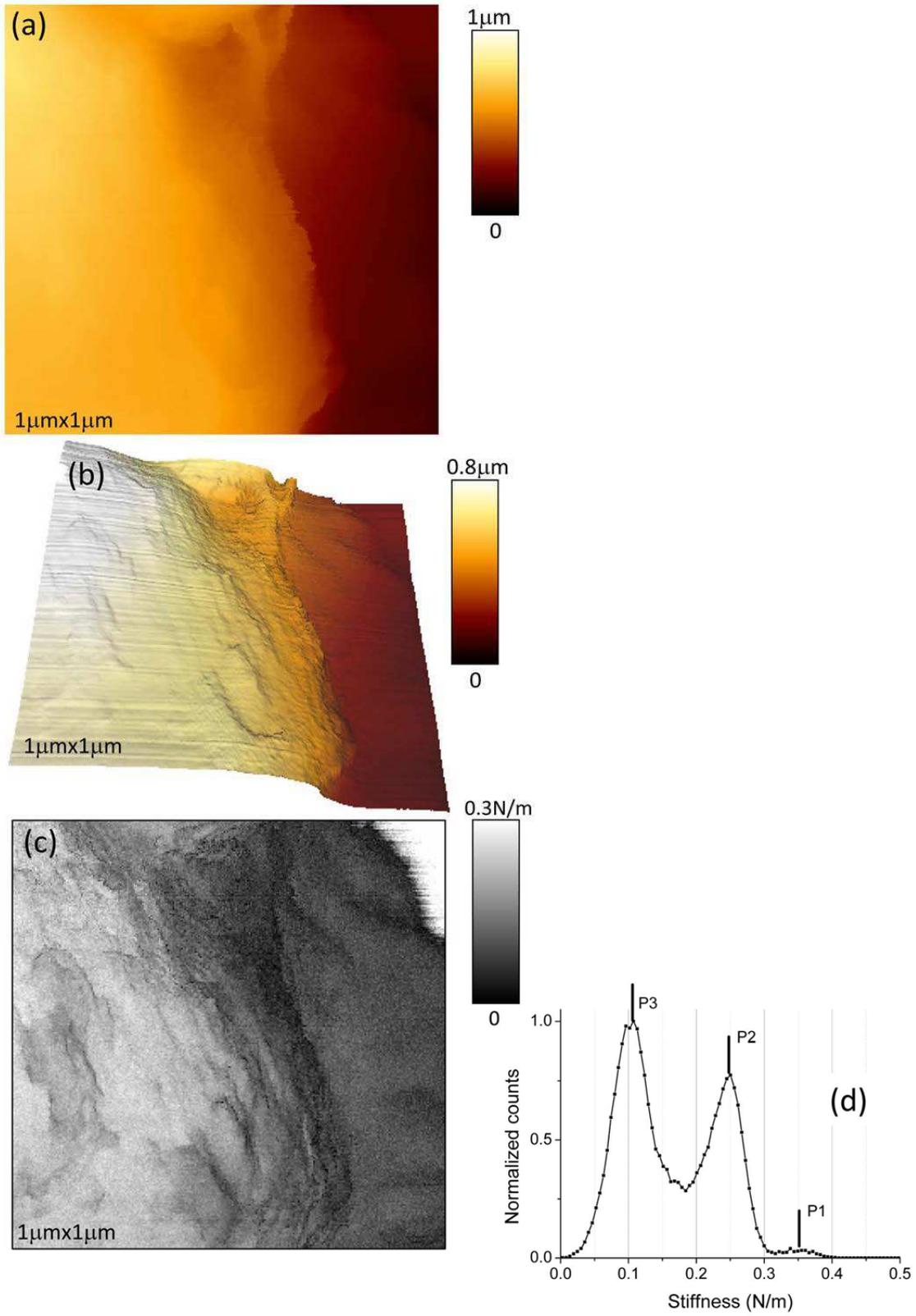


Figure 4. AFM height and stiffness data for *Rhodococcus wratislaviensis*. AFM height (a–b) and stiffness (c) images of *Rhodococcus wratislaviensis* in MM medium are shown. These images are taken at zone delimited by the white square in figure 1. Stiffness histogram related to AFM stiffness image (figure 4.c) is shown in figure 4.d. doi:10.1371/journal.pone.0061663.g004

marked by a short vertical segment as indicated in figures 6.b and 6.c.

We will successively describe three typical sets of AFM data of the *Nostoc* cyanobacteria. The maximum applied force during the approach of the AFM tip was 10 nN.

The first one is that mentioned above when describing surface displacements as measured by optical microscopy (figure 6). Five successive AFM images (64×64 pixels; 40.3 μm×7.6 μm) are shown in figures 7.1 to 7.5. In figure 7.6, an optical image (such as in figure 5) was numerically modified to approximately get the same magnification as for AFM data. Figures 7.5 (AFM data) and 7.6 (optical data taken fifty microns far away from the investigated AFM scanning zone) remarkably revealed the same type of features: nodules with an average length of around 4 microns are evidenced with two small vertical bumps in front and back

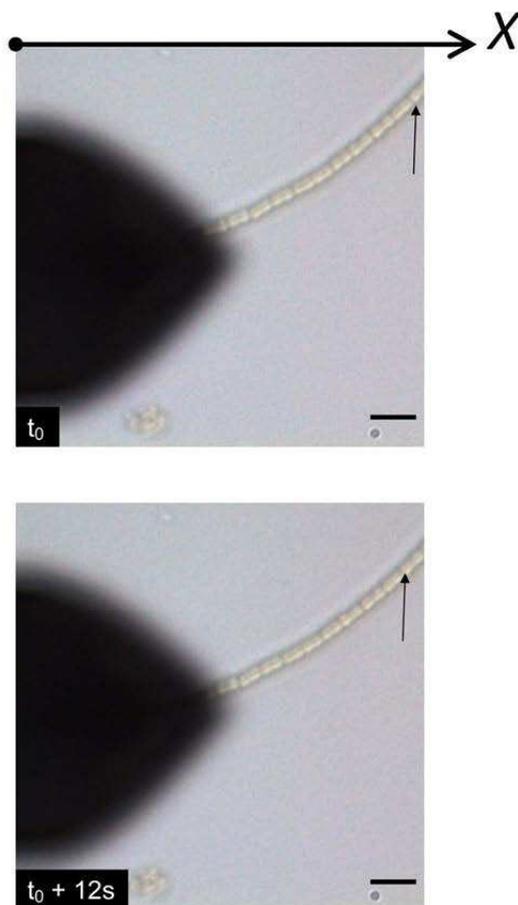


Figure 5. Optical snapshots of the gliding *Nostoc*. Optical snapshots of the gliding *Nostoc* bacterium upon the glass slide are shown. The scale is given by the black line (10 microns). The bacterium is moving from the right to the left of the images as indicated by the displacement of the landmark (arrow) between the two images ($\Delta t = 12s$). doi:10.1371/journal.pone.0061663.g005

positions. The mean height and width of *Nostoc* are estimated to $2.2 \pm 0.2 \mu m$ and $1.8 \pm 0.2 \mu m$ respectively (figure 8). The *Nostoc* is clearly moving from left to right of the scanned region between images 1 and 2 (figure 7) before gliding in the opposite direction between images 2 to 5. In figure 7.3 a slight distortion in the structure of the nodules is visible: there is indeed a shift of the left extremity of each nodule towards the left side of the image between its bottom and top (i.e. along the vertical scan direction). From these AFM data, the axial deformation across the width of the bacterium was measured and its value is equal to $1.5 \mu m$. As seen in figure 6.c, the bacterium is accelerating—as determined by optical data—during the acquisition of AFM image number 3 (maximum absolute speed around 500 nm/s). As the mean width of the bacterium is around 2 microns (see below), the related AFM vertical scanning time of bacterium along its width is estimated to about 9 seconds. The resulting deformation is thus evaluated to 2 ± 0.5 microns, very similar to the directly measured value ($1.5 \pm 0.1 \mu m$). One important consequence of this consistency between AFM and optical data is that we observe the same movement along the whole chain of nodules. It means that hypothetical perturbations caused by AFM scanning to the *Nostoc* are minimal. This conclusion is enforced when variation of the “head” of the *Nostoc*, as measured by AFM (figure 6.b, stars) or optical microscopy (figure 6.b, solid line), are compared. There is a remarkable correlation between the first three AFM images. A small discrepancy is visible for the following images (labeled 4 and 5) we can explain by the following reason. During the scanning of AFM image #3 (between the short vertical segments labeled 3 and 4 in figure 6) the bacterium is accelerating to reach a speed of around 500 nm/s. Thus the head nodule of the bacterium rapidly approaches the left border of the AFM image (image 4 in figure 7) and may glide beyond this AFM scanning frame. So the nodule we checked at the extreme far side in image 4 (figure 7) may not correspond to the head nodule of the bacterium but to the second one. The distance between these two nodules is 4 microns, the typical value of a nodule length. This distance perfectly fits with the deduced offset, around 4 microns, (figure 6.b) from the vertical shift between the optical data (solid line in figure 6.b) and AFM one (star labeled 4 in figure 6.b). The same kind of explanation well fits for the last AFM image (image 5 in figure 7) as a second nodule passed through. These arguments further enhance the idea that no major perturbation of the natural gliding of the *Nostoc* is caused by the AFM tip movement during scanning. From these optical and AFM data a mean gliding speed of 80 ± 10 nm/s is measured for the *Nostoc* in this first sequence.

We will now focus on effective stiffness data. Four examples are given in figures 8, 9 where height and effective stiffness profiles are plotted, along the vertical dash or dash/dot lines, either for different positions of the profile in a same AFM picture or at different positions of the bacterium on the sample (figures 8 and 9). The plateaus at both sides of these stiffness profiles correspond to the hard surface, the glass slide. In figure 8.d, the mechanical profile over the bacterium reveals a central part with an effective stiffness of around 0.22 N/m and edges about one order of magnitude lower, around 0.06 N/m. These lateral zones with a low value for stiffness are related to the small ribs visible in the height profile (see blue circles in figures 8.f) with a thickness of few hundreds of nanometers. These zones may very likely be related to the presence of a polymeric ECM layer. Furthermore the stiffness

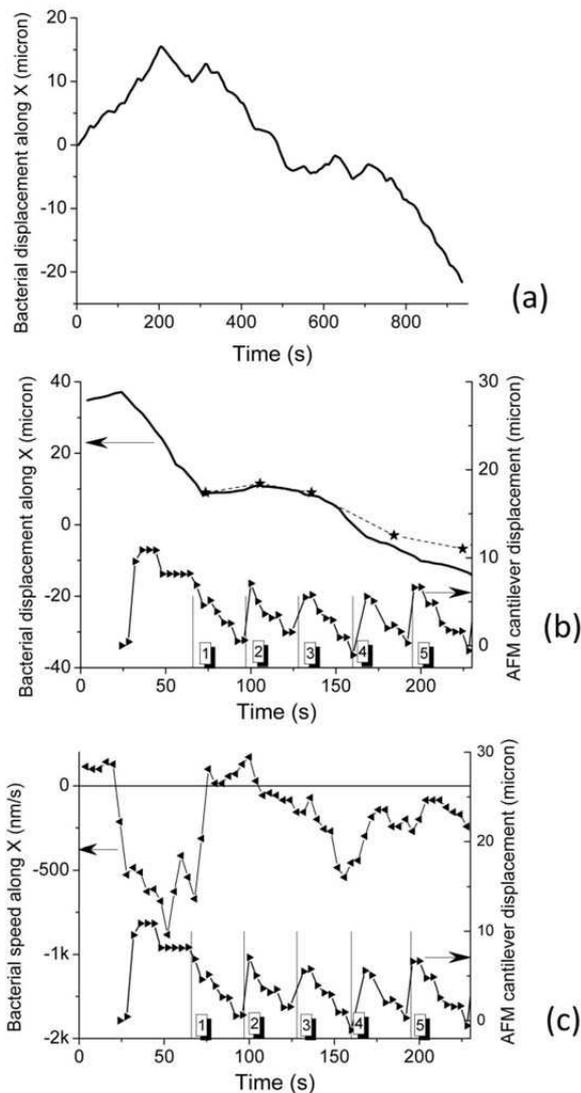


Figure 6. *Nostoc* displacement and speed curves as measured by optical microscopy. Figures 6.a–b: The displacement, along the X axis (see figure 5), of a *Nostoc* bacterium, as determined by optical microscopy, is plotted (full line) versus time during its gliding movement on the surface of the glass slide. The AFM cantilever is 500 nm far from the substrate. Figure 6.b: The displacement along the X axis of another *Nostoc* bacterium, as determined by optical microscopy, is plotted (full line) versus time. These data are related to the sequence labeled “number 1” in the main text. The AFM tip is now in contact with the substrate and scans it. The AFM fast scan direction is along X. The movement of the AFM cantilever along Y (slow axis) is plotted versus time (black triangles; the line is a guide for the eye): every triangle corresponds to a measured position (one optical image every 4 seconds). The starting times of the successive AFM images are marked by the short vertical segments. The indexation number of the AFM images is labeled in the squared box. The successive X positions of the bacterium as determined from AFM images (see figure 7) are marked by the stars (*), the dashed line being a guide for the eye. The scanning time for a full AFM image is 35 seconds. In figure 6-c (upper curve with left triangles) gliding speed along X axis of *Nostoc* as calculated from to displacement data in figure 6.b is plotted versus time. doi:10.1371/journal.pone.0061663.g006

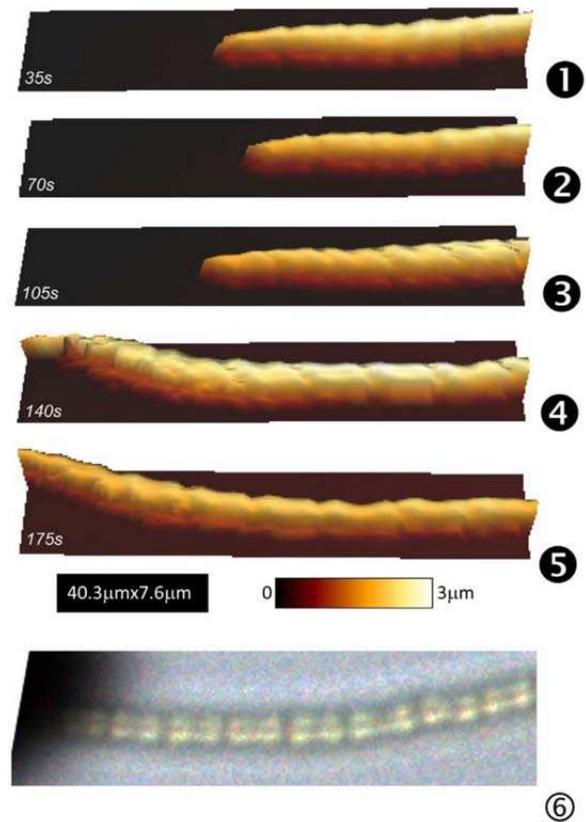


Figure 7. AFM height images of *Nostoc* (sequence #1). Successive AFM height (1–5) images of *Nostoc* cyanobacterium in its physiological medium are plotted. Time interval between two consecutive images is equal to 35 seconds. For comparison, an optical image acquired during this AFM sequence was numerically treated to get the same magnification as in AFM images (1–5). doi:10.1371/journal.pone.0061663.g007

value of that ECM is slightly lower in the concavity of the nodules chain than on the other side (60 ± 5 mN/m instead of 70 ± 5 mN/m). Same kinds of features are observed along the profile near the head extremity of the gliding bacterium (figures 8.c and 8.e). As previously the stiffness at the concave edge of the bacterium (ECM) is lower (70 ± 5 mN/m instead of 90 ± 5 mN/m for the convex side) but this effect is more pronounced. In case of a lower curvature of the *Nostoc* (figure 9) the dissymmetry for the stiffness values of the ECM between both sides of the bacterium is small: 90 ± 5 mN/m in the concavity to be compared to 85 ± 5 mN/m on the other side. It looks like the measured lateral dissymmetry in stiffness is related to the concavity along the bacterium: greater the local curvature is, higher is this stiffness dissymmetry.

Another important feature we observe (figures 8.a and 9.b) is the modulation of the effective stiffness along the longitudinal axis of the bacterium as zones with high stiffness, around 0.2 N/m. The spatial period of these high stiffness zones is estimated to 20 μm , the equivalent of roughly 5 nodules. The zones with low stiffness value predominate as the mean value of the effective stiffness for the bacterium as obtained from the histograms in figures 8.g and 9.i is equal to 70 ± 5 mN/m.

When contrast in both height (figure 9.c) and stiffness data (figure 9.d) is enhanced, minute details ahead of the *Nostoc* bacterium appear: it is clearly visible that the bacterium left a trace

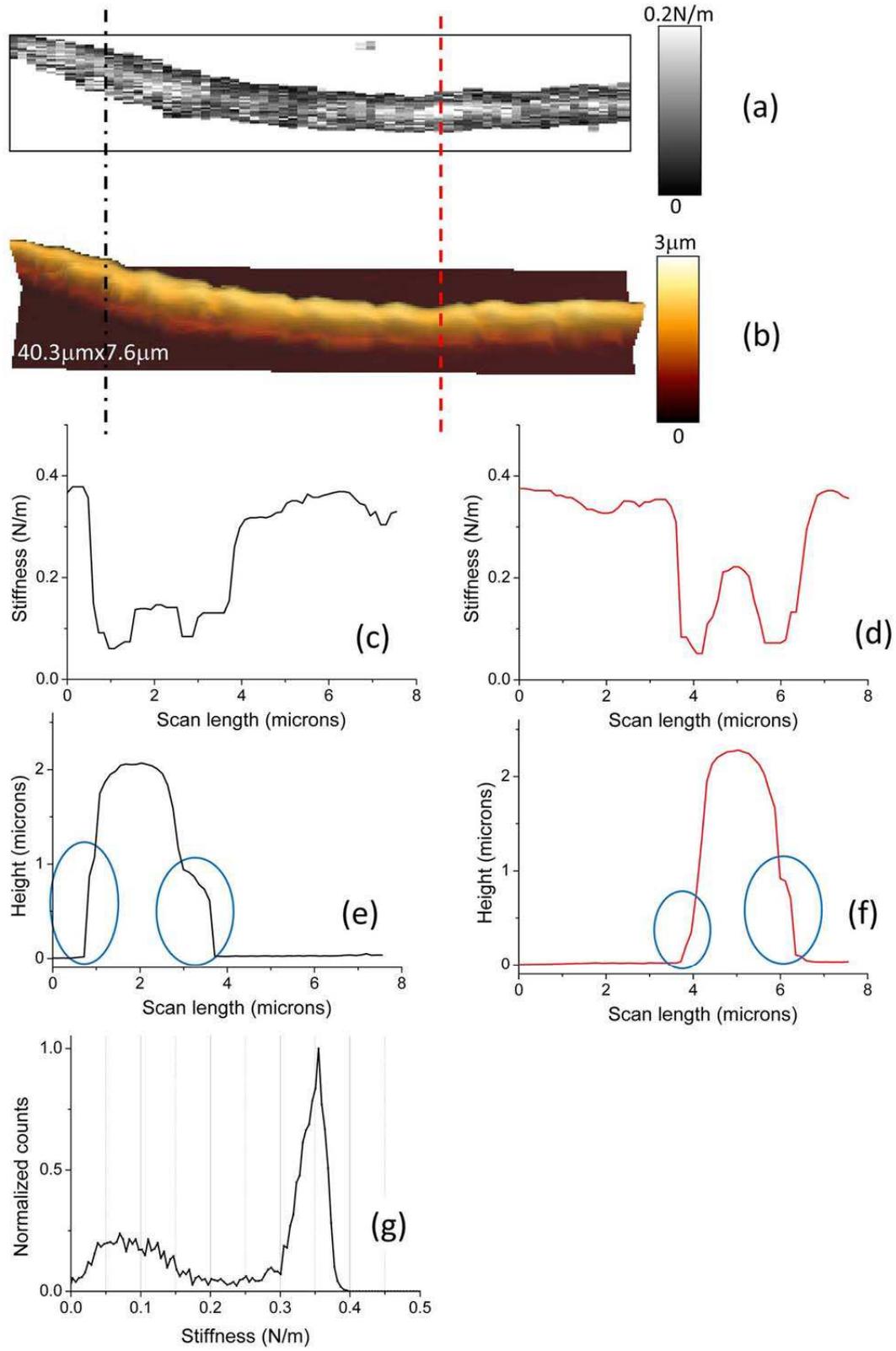


Figure 8. AFM height and stiffness data for *Nostoc* (sequence #1). AFM stiffness (a) and height (b) images of *Nostoc* in its physiological (BG11) medium are shown. They correspond to image 7.5. Stiffness (c) and height (e) profiles along the black dash/dot line in figures (a) or (b) are plotted. Stiffness (d) and height (f) profiles along the red dashed line in figures (a) or (b) are plotted. The blue circles in figures 8.e and 8.f were drawn to point out the presence of ECM at the edges of the *Nostoc* profile.
doi:10.1371/journal.pone.0061663.g008

during its former backward and forward movements. Profiles along the black vertical dash/dot line (figure 9.a d) are plotted in figures 9.e and 9.g. A polymeric deposit with a typical height in the range of few nanometers is evidenced. The slime thickness is higher on both sides (around 6 nm) than in its central part (≈ 3 nm). Stiffness histogram plot (figure 9.j), as calculated on the portion of figures 9.a d without the bacterium (at the left side of the dotted line in figures 9.a d), reveals the presence of two peaks: that for the hard substrate and the other (0.30 ± 0.07 N/m) for the slime. It must be pointed out that this value for slime stiffness is likely overestimated: as the slime layer is thin (≈ 3 nm), the partial indentation of the substrate cannot be excluded; so we measured a mixed contribution of the slime itself and the glass substrate. Nevertheless the presence of that slime is clearly evidenced in the stiffness profile (see figure 9.g). Furthermore stiffness value at lateral concave part of the slime is lower (0.26 ± 0.01 N/m) than in its convex part (0.29 ± 0.01 N/m). The two sides of the slime track have very near heights: 5.3 ± 0.1 nm and 6.1 ± 0.1 nm at the left and right sides of the track respectively. If we hypothesize that the intrinsic slime stiffness is constant, small variations of the slime height will cause important changes in the resulting stiffness values: indeed, as thinner is the slime layer, higher the influence of the hard substrate and, correlatively, the resulting stiffness value would be. However we can note that in the present case (figures 9.e and 9.g) the thinner slime deposit (left side in profile 9.e) is related to a lower value of stiffness. We can thus conclude that there is a slight but detectable difference in the elastic properties of the slime between its both sides: slime stiffness is very likely lower in the concavity (left side in profile 9.g), a similar result to that noted for ECM. From these results, we can conclude that the more the concavity along the bacterium is marked, the greater the lateral dissymmetry in stiffness for both slime and ECM likely is.

The second set of data about *Nostoc* bacteria is now studied. We first observe optically that, in this case too, the gliding of the *Nostoc* bacteria along the surface of the glass slide is parallel to the symmetry axis of these filamentous cyanobacteria. An optical estimation of the mean speed along the vertical axis of the image led to a value of 200 ± 20 nm/s. Successive AFM images of the *Nostoc* bacterium are presented in figures 10.a c (force set point was set at 9.4 nN; scanning time for one picture is 79 s). They show that the bacterium is moving from the bottom to the top of the image. Height images in figures 10.a, 10.b and in the upper part of figure 10.c (above the wide white line) are displayed with the same contrast. The characteristic shape of connected elementary nodules with a mean length of around 4 microns and a mean height of 2 microns (see height profile in figure 11.b0) is clearly visible in figures 10.a and 10.b. One remarkable feature must be pointed out: between the images 10.a and 10.b, a vertical shift of the main features, along the symmetry axis of the cyanobacterium, is evidenced and illustrated in figure 10.d. In this artificially recomposed picture, the height data from AFM picture 10.a was numerically up-shifted by 19.3 ± 0.2 μm (white arrow) and superimposed over figure 10.b. The correlation between both images is good as main features of the *Nostoc* are well recognizable in two AFM pictures. It is thus possible to estimate the gliding speed by AFM: we get a value of 245 ± 25 nm/s, very close to that obtained using optical evaluation (200 ± 40 nm/s). In figure 10.c (top part; same height scale as in figures 10.a and 10.b), there is no

more bacterium in the AFM image as the cell glided away from the AFM scanned zone. An estimation of the *minimum* gliding speed between images 10.b and 10.c leads to a value of 260 ± 25 nm/s. As seen in figure 10.c (lower part) where an enhanced color scale (range = 30 nm) was used, the passing-away of the *Nostoc* on the glass sample due to its gliding left a deposit of a slime layer: its mean thickness is about 15 nm (figure 11.s1) with a slightly higher value in the concavity of the bacterium curvature. Corresponding stiffness images are plotted in figure 12 with a common stiffness range in their upper parts and with adapted enhanced contrasts in their respective lower parts (below the wide black lines). These data corroborate our observation made earlier: a thin layer of a soft material, the slime, has been left by the cyanobacterium on the glass during its gliding movement. The mean slime stiffness is around 0.22 ± 0.01 N/m as seen in profile (figure 11.s2) made along blue line in figure 12.c and in histogram plot in figure 12.d (crosses). This value is similar to that measured in the former set of data (sequence #1). We note too that the slime stiffness (figure 11.s2) is slightly smaller in the concavity of the *Nostoc* curvature: this effect is very likely not due to a spurious effect of the underlying substrate as the slime thickness (figure 11.s1) is not negligible (around 15 nm) and varies only slightly along the profile. As seen in the profile plotted in figure 11.b2, the stiffness of this fast gliding bacterium has a higher mean value (around 0.2 N/m) and a much lower standard deviation than in the formerly described slow gliding regime. This is confirmed by the histogram in figure 12.d (solid line): the peak corresponding to the mean stiffness of this fast bacterium (220 ± 20 nm/s instead of 80 ± 10 nm/s for sequence #1) is surprisingly of a much higher value than that determined for sequence #1: 0.18 ± 0.01 N/m instead of 70 ± 5 mN/m. A spurious effect due to the underlying substrate can be ruled out as the mean thickness of the bacterium (figure 11.b0) is in the micron range and thus is much higher than the typical indentation depth (few tens of nanometers). Our data reveal that the increase of the gliding speed of the *Nostoc* upon the glass slide may be related to an enhancement of its stiffness. Such correlations between mechanical properties and motility of cells were already shown in literature. For instance, the migration speed of cell increases with the hardness of the substrate [42]. Here again the stiffness profile (figure 11.b2) reveals slightly lower values at the border of the bacterium but the contrast between the stiffer central zone and the ECM is far less prominent than for sequence 1.

A last sequence of data about *Nostoc* bacteria is presented (figures 13). The main direction of movement (first image: figure 13.a; second one: figure 13.b) of the bacterium (from top to bottom of AFM image) is opposite to slow scanning direction of AFM tip. From the AFM data the mean speed of the *Nostoc* bacterium is evaluated to 120 ± 10 nm/s. Two consecutive stiffness images, separated by 137 seconds, are presented in figures 13.a b. Slime left by the bacterium during its former movement is clearly visible (figures 13.a and 13.b) by the curved track in light gray. The *Nostoc* is shown to change its direction of propagation by leaving its former track and going straight down the AFM image. We can notice (figure 13.a) that no slime is secreted ahead of the bacterium. It confirms former results of Yu and Kaiser [43], where emission of slime was only visible at one pole of *Myxococcus xanthus*, at the end of the cell. Height (figure 13.c) and stiffness (figure 13.d) profiles on the bacterium along solid (figure 13.a) and

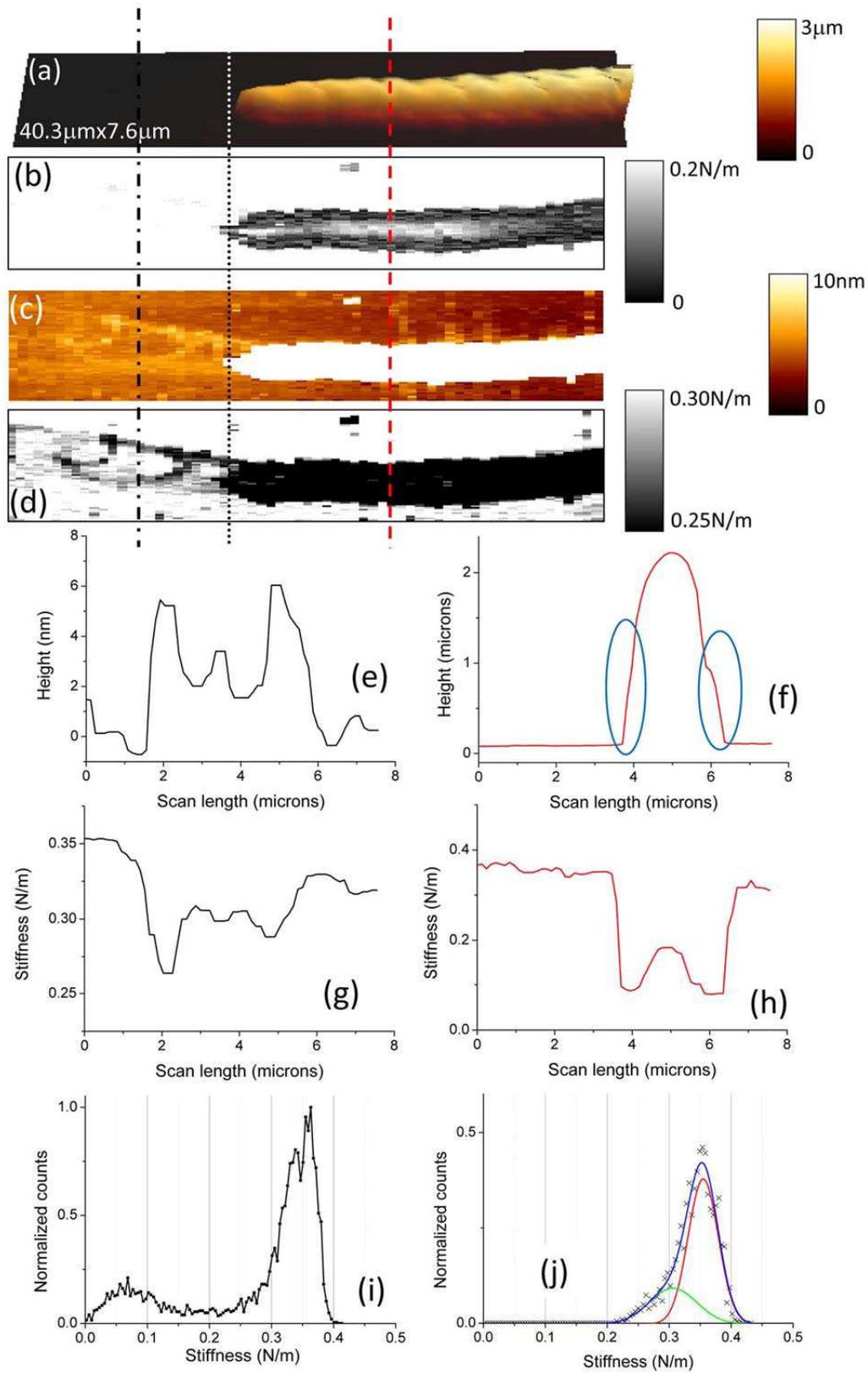


Figure 9. AFM height and stiffness data for *Nostoc* (sequence #1). AFM height (a, c) and stiffness (b, d) images of *Nostoc* in BG11 medium are shown. They correspond to image 7.3. In images (b) and (d), the contrasts were increased to show the presence of the slime layer. Height (e) and stiffness (g) profiles along the black dash/dot line in figures (a–d) are plotted. Height (f) and stiffness (h) profiles along the red dashed line in figures (a–d) are plotted. Stiffness histogram related to the whole stiffness image (figure 9.b or 9.d) is shown in figure (i). In figure (j), the histogram was calculated to the only portion of image 9.b (or 9.d) at the left side of the dotted line. The peaks resulting from the deconvolution of this histogram are plotted with colored lines.

dashed lines (figure 13.b) have been plotted. Both sides of bacterium, where ECM is likely present, still reveal smaller values of stiffness (50 ± 5 mN/m) in a similar way to sequence #1. However no clear dissymmetry between both sides is visible here. Profiles at the lower part of AFM images, where slime track and bacterium are spatially separated, are plotted in figures 13.e and 13.f. The stiffness of the bacterium (figure 13.f) near its head nodule reaches values as low as 30 ± 5 mN/m and does not present dissymmetry as observed in the former cases. This may be correlated to the straight movement of the *Nostoc*. As before, harder points are still present along the bacterium: their stiffness values approximate 0.2 N/m. For this studied sequence, stiffness of the slime track has a high value around 0.23 N/m (figure 13.f) for a mean value of thickness of 8 nm (figure 13.e). As observed earlier, the slime layer is slightly thicker at the concave side. The presence of two distinct levels for stiffness for the bacterium and its slime is confirmed by histogram plots (figure 13.g) of stiffness data from figures 13.a–b. The peaks at 0.25 ± 0.01 N/m related to the two successive images 13.a and 13.b have almost the same amplitude. Thus they correspond to the slime zone as this one does not significantly change in area (same number of pixels in images) during the movement of bacterium as evidenced in both images 13.a and 13.b. Instead, the peak at 0.07 ± 0.01 N/m (figure 13.g) can be related to the bacterium as its intensity increases when the

Nostoc glides down the AFM scan zone. That value, averaged over the whole length of the *Nostoc* including the high stiffness zones and ECM, is low as already observed for the other example of low gliding speed (sequence #1). It must be emphasized that good reproducibility of our AFM measurements both for height and stiffness is clearly evidenced in figures 13.e and 13.f on slime signals, i.e. for the left part of the profiles.

Discussion

Thanks to our improved combination of an easy-to-apply and gentle sample preparation procedure and an efficient AFM method (QI mode, JPK) –see Material and Methods section for more details- we were able to visualize and mechanically characterize - in excellent conditions - very different bacterial strains in their living state. These experiments were done with bacteria in their respective physiological liquid media on standard glass samples. The most tremendous example is the AFM imaging of *Nostoc* cyanobacterium, at an unprecedented spatial resolution, during its natural gliding movement. The study of cyanobacteria indeed showed, for the first time, that it is possible to perform AFM images of high quality on a motile organism gliding over the surface of a glass slide at speed as high as 250 nm/s, i.e. up to 900 $\mu\text{m}/\text{h}$. This was possible because (i) no immobilization step of

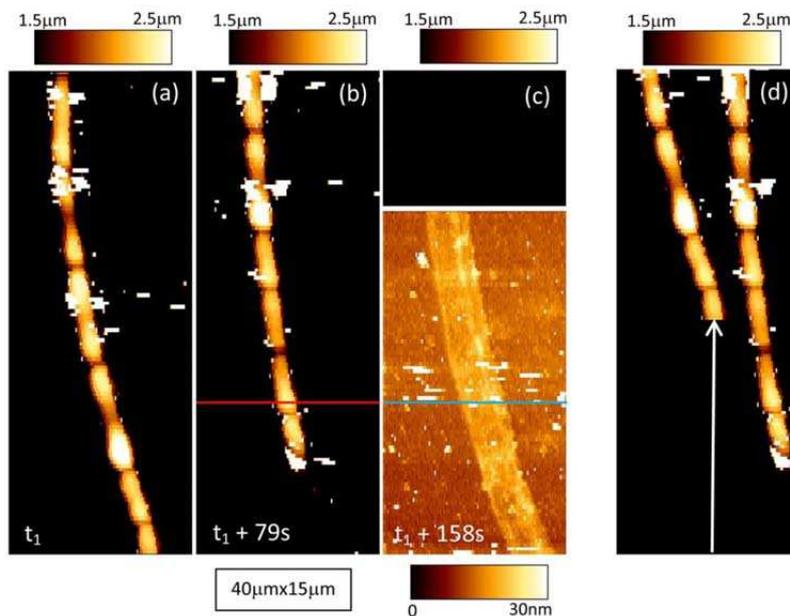


Figure 10. AFM height images of the gliding *Nostoc* (sequence #2). - Figure 10.a–c: Three AFM height images of the gliding *Nostoc* bacterium upon the glass slide. In figure 10.c, the bacteria glided away from the AFM scan zone. A common color scale for height was applied for all these images except for the lower part (below the thick white line) of picture (d) where height contrast was enhanced. - Figure 10.d: Visualization of the vertical gliding movement of the *Nostoc*. It is done by the superposition of the image of the bacteria as determined in figure 10.b (bacterium at the right side of image 10.d) with that measured at t_1 , 79 s earlier (figure 10.a) and vertically shifted along the white arrow (shift length: 19.3 ± 0.2 microns). For reasons of clarity a lateral shift between the native figures 10.a and 10.b was applied.

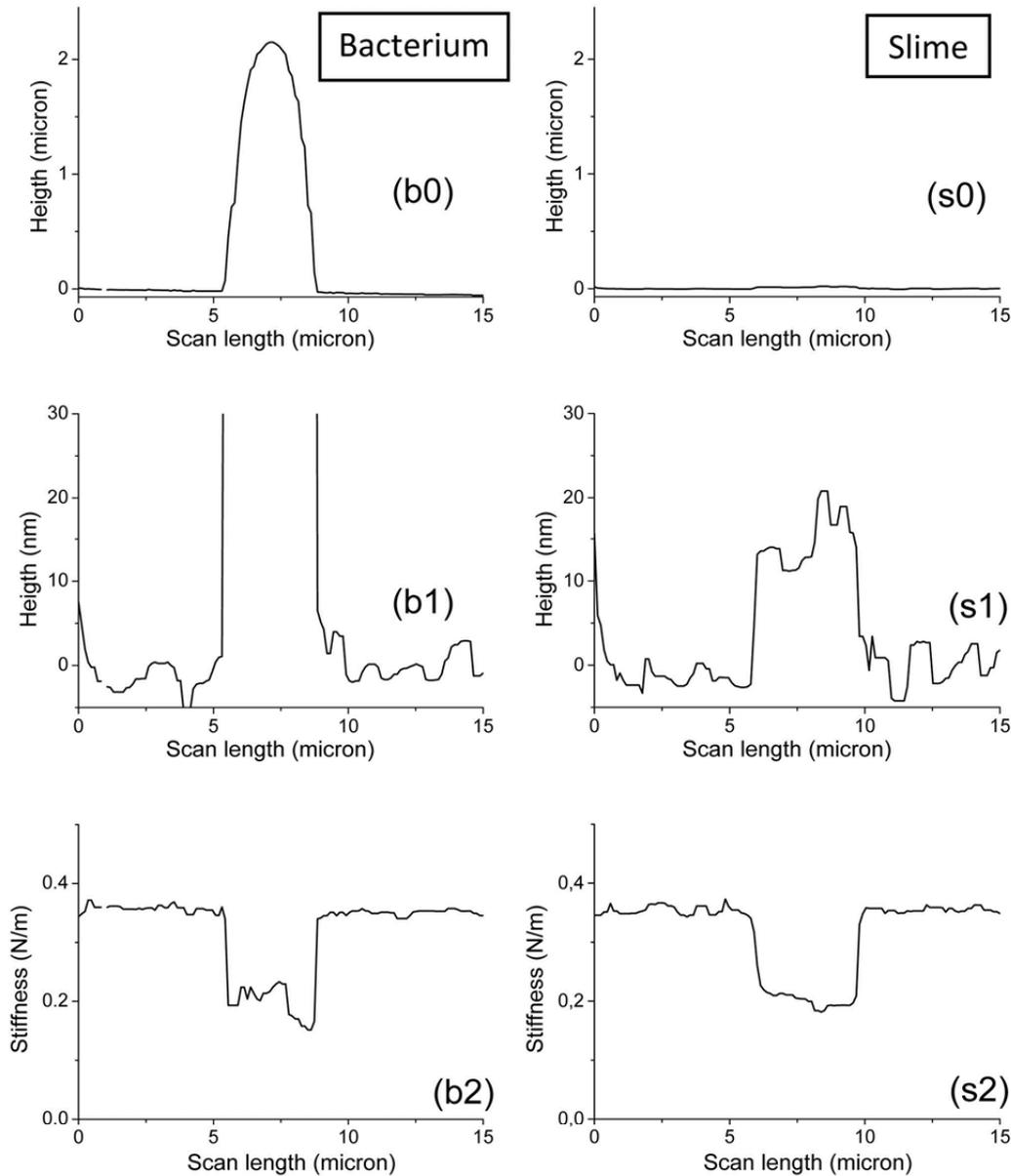


Figure 11. AFM height and stiffness profiles for *Nostoc* (sequence #2). AFM height ($_0, _1$) and stiffness ($_2$) profiles for *Nostoc* bacterium ($b_$) along red line in images 10.b and 12.b and for the excreted slime ($s_$) along blue line in images 10.c and 12.c are plotted. Height profiles in figures $_b0$ and $_s0$ are displayed with the same height scale. Idem for those in figures $_b1$ and $_s1$ but with an enhanced contrast. doi:10.1371/journal.pone.0061663.g011

the bacteria, based on chemical or mechanical entrapment was needed and (ii) the used AFM mode does minimize lateral interactions between the AFM tip and the substrate during the successive, well-controlled and high speed approach/retract curves. This method can be applied to many types of bacteria: Gram-positive and Gram-negative as well, bacteria with very different types of shape and surface behavior. These bacteria can be studied in purely native conditions without any external stress. The characteristics of gliding movement of the *Nostoc* as deduced from both optical and AFM data were found to be identical. Furthermore no correlation, and consequently no disturbance,

between the AFM tip movement and *Nostoc* gliding was observed. These two last points enforce the conclusion of no major perturbation of the natural bacteria gliding by the scan of the AFM tip upon the cell during imaging. The bacterium is thus staying in its standard living state. AFM study of the Gram-positive *Rhodococcus wratislaviensis* does not reveal any detectable movement of the bacterium. We thus obtained highly spatially resolved AFM images of *R. wratislaviensis* in native conditions for standard scan times. Minute details on their membrane were revealed by both topographic and mechanical stiffness data. For instance, small protuberances on the *R. wratislaviensis* membrane are observed in

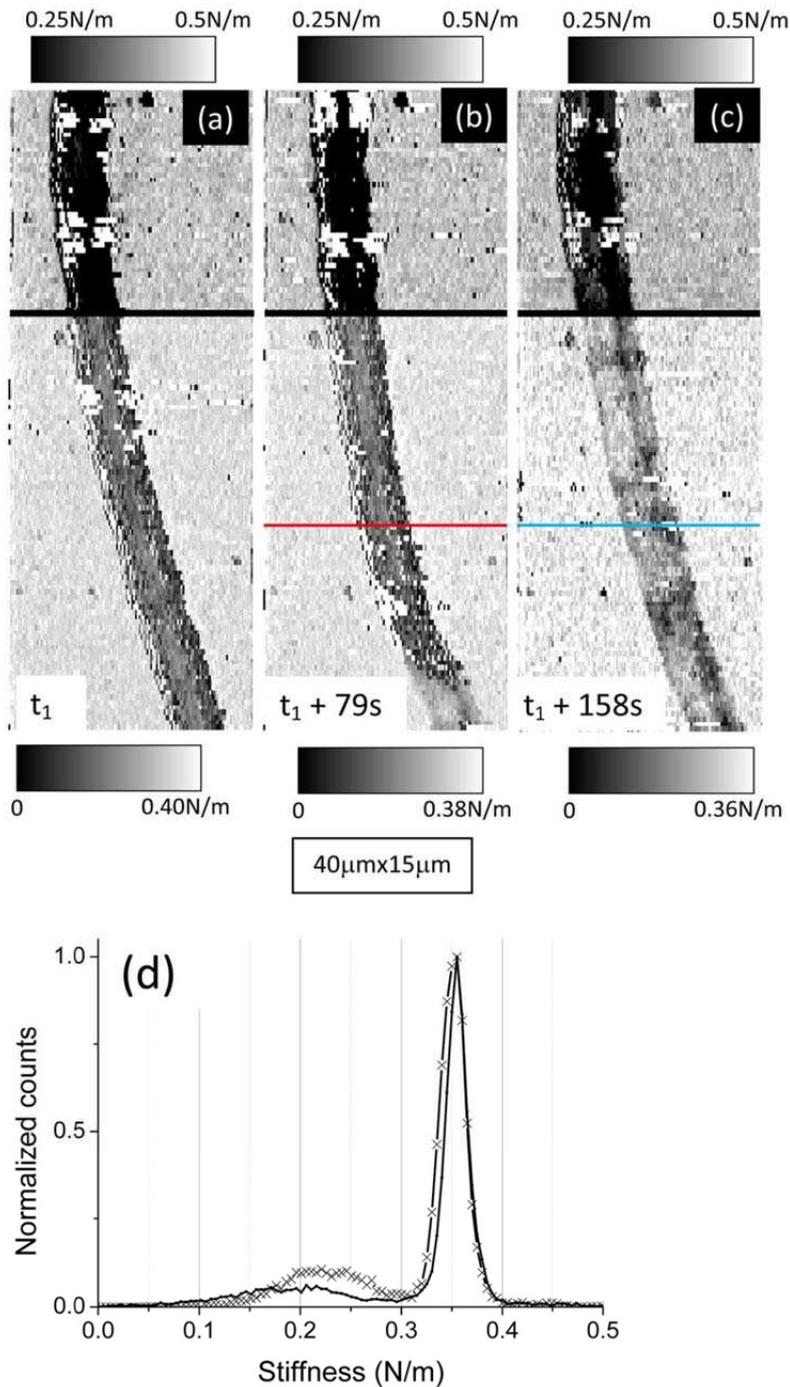


Figure 12. AFM stiffness data of the gliding *Nostoc* (sequence #2). *Nostoc* AFM stiffness images are shown. They correspond to the three equivalent height images in figure 10.a–c. A common grey scale for stiffness was applied for the upper part (above the wide black line) of these images. At the lower parts stiffness contrast was enhanced. In figure 12.d stiffness histograms for *Nostoc* bacterium (solid line) and slime (crosses) are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0061663.g012

height images and correspond to zones with slightly lower stiffness. Furthermore height and stiffness images revealed the presence of low swellings (thickness and lateral extension in the range of few

hundreds of nanometers) of a soft polymeric slime layer on one (right) side of the bacteria. This could be due to the deposition of a slime layer by *R. watslawiensis* in an initial slight migration upon

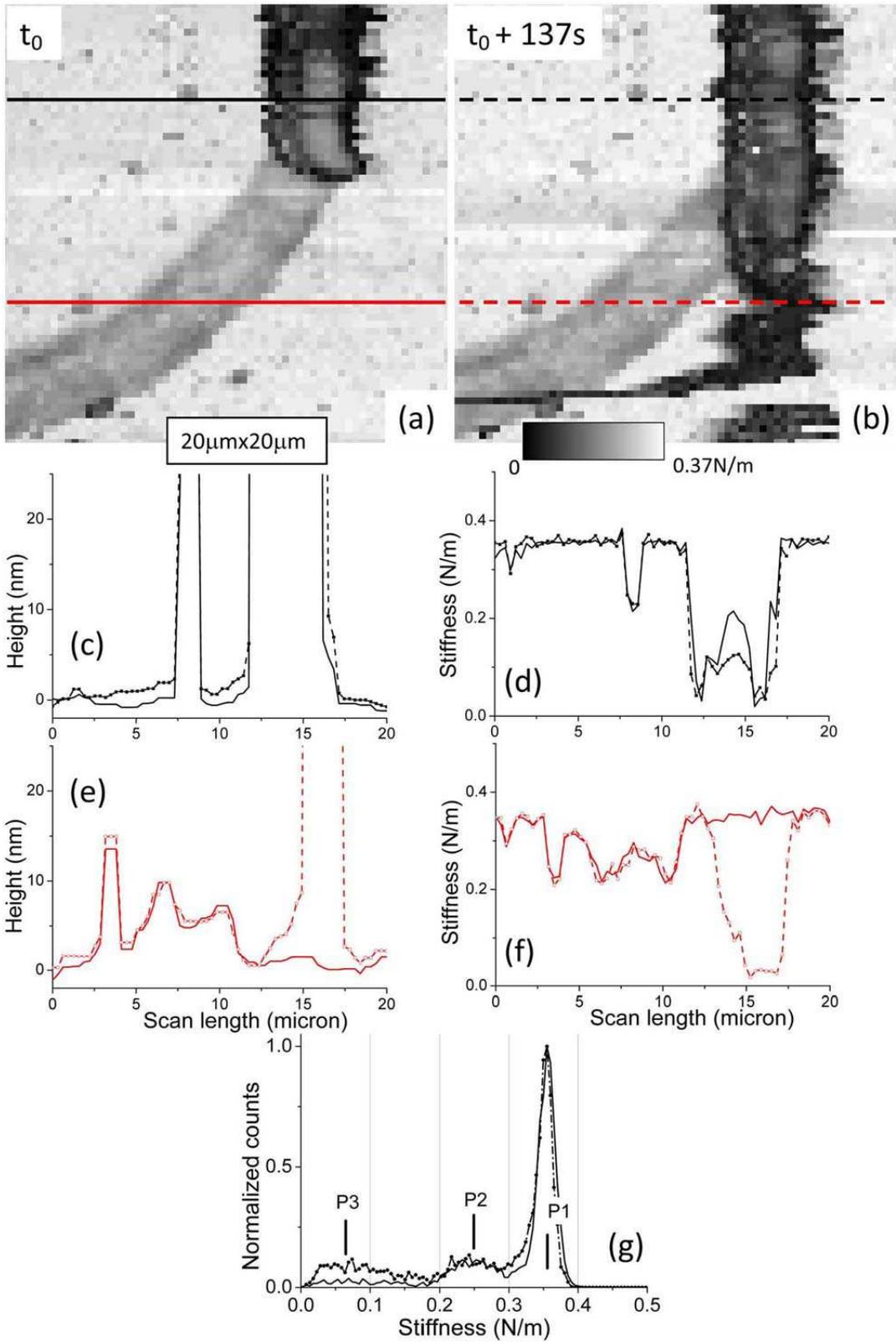


Figure 13. AFM stiffness and height data for *Nostoc* (sequence #3). a, b: two successive AFM stiffness images of *Nostoc* are shown. Height (c) and stiffness (d) profiles along the black full line in image (a) and the black dashed line in image (b) are plotted with full and dashed lines respectively. Height (e) and stiffness (f) profiles along the red full line in image (a) and the red dashed line in image (b) are plotted with full and dashed lines respectively. Stiffness histograms related to AFM stiffness data from figure a (full line) and figure b (dots and dashed line) are shown in figure (g). doi:10.1371/journal.pone.0061663.g013

the surface followed by a self-immobilization process. This process would likely have occurred during the sample preparation before AFM experiments. The distance along which the cell slightly moves laterally before immobilizing could be tentatively estimated to 450 nm, the lateral extension of this slime compound. We think that this polymeric layer is likely involved in the adhesion of the bacterium to the glass slide and in the connections to neighboring bacteria, which are the early steps for the completion of a biofilm. Our new procedure is an important step forwards to detailed studies of the immobilization or motility of bacteria on surfaces and the related formation of biofilms as their genuine trends have not been artificially blocked by the observer.

Stiffness profiles and histograms made from the whole stiffness images brought important and complementary information to height images. We were thus able to distinguish between two or three main components for the bacterial complex depending on the bacterial strain (see table 1). In case of *R. wratislaviensis* we already mentioned the presence of a slime compound around the bacteria characterized by a low cellular spring constant, k_c , of 0.18 ± 0.07 N/m. Stiffness of the pure bacterial part is higher, 0.64 ± 0.15 N/m. We did not detect the presence of an ECM layer around the bacterium. Slight variations of the local mechanical properties of *R. wratislaviensis* were observed and related to topographic features. The situation is more complex for the *Nostoc* cyanobacteria. Three main components with various mechanical characteristics were revealed by our experiments: (i) the bacterium with zones of higher stiffness values (up to 0.64 ± 0.15 N/m) located in its central part, (ii) the ECM compound, mainly situated along the edges of the bacterium, with a stiffness varying from 0.09 ± 0.03 N/m for low gliding speeds (below 150 nm/s) to 0.29 ± 0.08 N/m for speeds higher than 200 nm/s and (iii) a track of slime left by the *Nostoc* behind it during its gliding movement. Along the longitudinal axis of the *Nostoc*, we observed the presence of delimited zones of high stiffness with a spatial periodicity not related to that of the nodules: only few of them are in a state of high stiffness. The period is estimated to 20 μ m, which corresponds to roughly 5 nodules. The longitudinal position of these high stiffness regions along the chain of nodules, relatively to the head extremity of the *Nostoc* (figures 8.a and 9.b), seems to be preserved during the gliding. That is why a hypothetical explanation based on high-stiffness areas associated to *mobile* bacterial nucleoids underneath the bacterial membrane as in *E. coli* bacteria [44] can be likely ruled out. In case of a fast gliding *Nostoc* (speed higher than 200 nm/s) the mean value of stiffness averaged on the whole bacterium is much higher (around 0.36 ± 0.10 N/m) than for slow cyanobacteria (<150 nm/s). These data may reveal a hardening process probably related to the fact that the gliding speed of the bacterium on the glass slide is noticeably greater.

To summarize our results on mechanical properties of the two bacterial strains, it can be written that the typical values for cellular spring constant of the bacterium we measured are in the range of few 10^{-1} N/m. Many AFM studies on the determination of local mechanical properties, as the cellular spring constant, have been already done on different bacteria in many experimental conditions. A rather complete synthesis about these mechanical properties of cells (mainly bacteria), mostly artificially immobilized on substrates, is proposed in reference [45]: k_c typically varies between 10^{-2} N/m and 10^{-1} N/m. It must be noted that most of

these results are in the range of 10^{-2} N/m, one order of magnitude lower than data presented in this paper. More experimental results can be found in [46–48]. One study [49] deals with Gram-negative *Shewanella putrefaciens* in potassium nitrate solution with a fixed ionic strength (0.1 M) and variable pH between 4 and 10: the conditions of immobilization of the bacteria on the substrate were similar to ours as no mechanical entrapment or chemical process were used, the main difference laying on a pretty harsh rinsing procedure. It yielded again to bacterial spring constants between 0.02 and 0.05 N/m. Nevertheless it must be emphasized that mechanical properties (cellular spring constant, Young modulus) of the cell surfaces are extremely sensitive to the surrounding environment or to special treatment [50]. In case of applied damage to the cell, the main observed trend is that the cell wall becomes softer as for Gram-positive *Staphylococcus aureus* (after digestion by lysostaphin) [51] or for Gram-negative *E. coli* as predated by *Bdellovibrio bacteriovorus* [52]. In that last case the cell spring decreases from 0.23 N/m for healthy cells to 0.064 N/m for invaded bacteria. As we proved the bacteria that we studied are fully alive (as they glide), these last remarks likely explain the high values of spring constant (~ 0.1 N/m) we measured when compared to most of the available results: artificially (chemically or mechanically) immobilized bacteria may have been damaged leading to spurious low values for stiffness. However more studies are needed as it was shown that, in few cases, *E. coli* cells can become stiffer when damaged by a heating shock [50].

An important feature was observed for *Nostoc* bacterium. During its gliding movement, it left a track of *slime* we directly evidenced by AFM height and stiffness data. Its stiffness was evaluated to approximately 0.2 N/m, much higher than ECM one, and does vary so much with the gliding speed. When the gliding speed increases, we note the presence of a *stiffer* ECM layer at the edges of the bacterium and the expulsion of a *thicker* slime layer (figure 14). Figures 9.e and 13.e related to low gliding speeds show that the slime thickness is higher on both edges of the track left by the *Nostoc* during its gliding movement. This effect is not visible for high speed sequence, probably because of an increased smearing of this thicker polymeric slime layer. As the ECM was mainly detected along the edges of the bacterium, the production of the slime could tentatively be related to the presence of the ECM along the bacterium. Production of ECM and slime might be connected. The higher value for the slime stiffness, when compared to that of ECM, could probably be due to a temporal change of the properties of the polymeric ECM layer secreted by the *Nostoc* during its gliding movement, an aging-like effect of the initial polymer.

From a careful look at stiffness profiles perpendicularly to longitudinal axis of *Nostoc*, a questioning observation has been done. Stiffness values of the ECM are not symmetrically distributed along the two edges of the bacteria where ECM is mainly located. It must be noted that similar decrease of k_c with increasing distance from the bacterium apex was already observed for Gram-negative bacteria *Shewanella putrefaciens* [53] and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [45]. According to our data, lower values for ECM stiffness are located at the concave edge and this effect is more pronounced for parts of the nodules chain with higher concavity. We also note that the stiffness of the slime is

Table 1. Values of effective stiffness and cellular spring constant (in italics) for the two studied bacteria and their different components.

| Strain | Sequence number | Gliding speed (nm/s) | Figure numbers | Bacterium | | ECM | | Slime | |
|---------------------------|-----------------|----------------------|----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | | Stiffness (N/m) | Mean value from histogram | Stiffest points | Stiffness (N/m) | Stiffness (N/m) | Stiffness (N/m) |
| <i>Nostoc</i> | #1 | 80±10 | 8; 9; 10; 11 | 0.07±0.02 | 0.20±0.05 | 0.07±0.02 | 0.33±0.05 | 4±2 | |
| | #2 | 220±20 | 14; 15; | 0.09±0.03 | 0.47±0.13 | 0.09±0.03 | 4.0±1 | | |
| | | | | 0.18±0.04 | 0.23±0.05 | 0.16±0.03 | 0.22±0.04 | 15±5 | |
| #3 | 120±10 | 16; 17 | 0.36±0.10 | 0.64±0.15 | 0.29±0.08 | 0.57±0.15 | 8±3 | | |
| <i>R. wratislaviensis</i> | | ≈0 | 3; 4 | 0.07±0.02 | 0.20±0.05 | 0.03±0.01 | 0.25±0.04 | | |
| | | | | 0.09±0.03 | 0.45±0.13 | 0.04±0.01 | 0.82±0.20 | 250±30 | |
| | | | | 0.23±0.05 | 0.24±0.05 | / | 0.12±0.02 | | |
| | | | | 0.64±0.15 | 0.72±0.18 | / | 0.18±0.07 | | |

doi:10.1371/journal.pone.0061663.t001

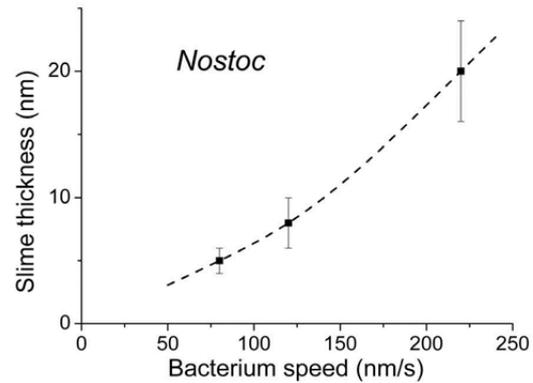


Figure 14. Variation of the slime thickness with the *Nostoc* gliding speed.
doi:10.1371/journal.pone.0061663.g014

systematically lower on the high concavity side in the three sequences. Does the motility machinery of the cell excrete a thicker and softer compound at the highest concavity edge in order to increase the friction coefficient and provoke the curved movement? New experiments are scheduled to answer this question.

Important mechanical parameter, as turgor pressure can be derived from the effective stiffness data (see Material and Methods section for details). Data available in literature are rather scarce and mainly obtained from investigations at low spatial resolution (unless a recent exception [54]). As a first step, we limited our study of turgor pressure to data averaged over the whole bacterium as deduced from the histogram plots in order to compare these results with data in literature. A detailed study of the spatially distribution of turgor pressure over the bacterium is under work. The mean values of turgor pressures for *Nostoc* and *R. wratislaviensis* bacteria in their growth medium are reported in table 2. For the Gram-negative *Nostoc*, our experiments show that the turgor pressure depends noticeably on the mean gliding speed: at low speeds (below 100 nm/s) we got an averaged value of 50±10 kPa, while it reaches 180±30 kPa in case of gliding speeds as high as 220 nm/s. The turgor pressure for low speed *Nostoc* is near from values reported in literature for artificially immobilized bacteria. Literature indeed reveals that turgor pressure for Gram-negative bacteria, in case of middle to high ionic strength medium as the growth medium used in our experiments, ranges from 10 to 40 kPa for *Pseudomonas aeruginosa* [7], *Shewanella putrefaciens* or *oneidensis* [55] and *Escherichia coli* [56]. These values are near to that we obtained. Measurements in distilled water or in any other medium with low ionic strength lead to values as high as 85–150 kPa as, for instance, for *Magnetospirillum gryphiswaldense* species [40] or *E. coli* [54]. That is one order of magnitude higher than for growth media with high ionic strength as expected from [8]. Thus there is a rather reasonable agreement between our results and those of literature. To our knowledge and as already mentioned, no data are available for living and moving bacteria as those in the present paper.

Data about Gram-positive bacteria are scarcer and reveal important dispersion. Determination of turgor pressure for *Bacillus-subtilis* was performed in its growth medium and led to a value of 1.9 MPa [57]. For *Enterococcus hirae* [8], experiments were conducted in distilled water and the measured turgor pressure was in 400–600 kPa range. This could be extrapolated to values around 50 kPa in growth medium with high ionic strength. The

Table 2. Turgor pressure for the studied bacteria at different gliding speeds.

| Strain | Sequence number | Gliding speed (nm/s) | Figure numbers | Turgor Pressure (kPa) |
|---------------------------|-----------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Nostoc</i> | #1 | 80±10 | 8; 9; 10; 11 | 58±5 |
| | #2 | 220±20 | 14; 15; | 174±15 |
| | #3 | 120±10 | 16; 17 | 42±5 |
| <i>R. wratislaviensis</i> | | ≈0 | 3; 4 | 307±30 |

doi:10.1371/journal.pone.0061663.t002

value we measured for *R. wratislaviensis*, 307 ± 20 kPa, is intermediate between these two min-max values found in literature.

Independently of the turgor pressure measurement, the Young moduli related to the bacterial envelope and components (figure 15) were calculated from the stiffness data (see Material and Methods section for more details). Resulting values of the Young modulus are shown in table 3. In the case of *Nostoc* (figures 15.a.1 a.3 and 15.b.1 b.3) the bacterium Young modulus only concerns the stiffest parts of the bacterium as the softest part have mechanical properties very similar to those of the surrounding ECM. It must be noted that Young modulus of the different *Nostoc* components noticeably increases between the slow gliding regime (sequences #1 and #3) and the high speed one. Literature reveals, even if studies are rather sparse, that the value for the elastic modulus of biofilms and isolated bacteria varies greatly, depending on the method used to measure it and the way samples were prepared and studied [18,50]. Furthermore, mechanical properties of bacterial biofilms are very dependent on the ratio between ECM and bacteria. So the comparison with results in literature is not an easy task as the tabulated values are highly dispersed. It must be mentioned that bacteria are often studied in conditions very distant from their genuine physiological ones. As an example, Young modulus values as low as 7 kPa were reported [58] on the biofilms of Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* at the interface of an agar surface and humid air. More typical values of the bacteria elasticity as determined by microscopic methods are rather in the range 5–50 MPa [56,59–61] as in references [56] (23 ± 8 – 49 ± 20 MPa) and [44] (between 10 and 20 MPa) for the Gram-negative *E. coli*. In a recent study [54], local measurements of Young modulus yielded to values around 1 MPa for *E. coli* in a 1 mM KNO_3 electrolyte. However values as low as 3 MPa for *E. coli* [50] and 0.04–0.2 MPa for Gram-negative *Shewanella putrefaciens* [49] were observed. The discrepancy between these data can be explained by the strong dependence of Young modulus values on the living or dead state of the bacteria [50]. Our data reveal that the *Nostoc* Young modulus noticeably increases with the gliding speed: from 20 ± 3 MPa below 150 nm/s up to 65 ± 5 MPa at speed near to 250 nm/s. As our study first deals, to the best of our knowledge, with Young modulus of living bacteria in physiological conditions, comparison with literature is tricky. However our results are reasonably comparable with these of former studies of Gram-negative bacteria. For Gram-positive ones, literature is very short of data. Measurements of cell wall Young modulus for *Bacillus subtilis*, performed by macroscopic methods [62], gave values from 13 GPa in dry environment to 30 MPa in humid air (around 90% in relative humidity). Measurements of the elastic modulus for archae *Methanospirillum hungatei* [63] was performed on sheaths isolated from the cell and suspended in deionized water. They gave a Young's modulus of 20 to 40 GPa. The elasticity of the complete cell boundary was obtained for the Gram-positive *Lactobacillus* [64]. The measurements were performed using AFM and the slope of the force-indentation curves

gave values for bacterial stiffness of $1.2 \cdot 10^{-2}$ N/m. Our original measurements for in-situ and living Gram-positive *Rhodococcus wratislaviensis* gave a Young modulus value of 104 ± 5 MPa.

Thanks to our method, values for Young moduli for the different components related to the bacteria, such as the bacterium itself, the slime and the ECM in case of the gliding *Nostoc*, are now available. For *Nostoc*, values of E_{young} for ECM and slime were shown to slightly increase with the gliding speed. For non-motile *Rhodococcus* and for *Nostoc* gliding at low speed as well, the slime layers have Young modulus values in the range of 1–4 MPa. As the *Rhodococcus* slime thickness is high (250 nm), there is no indentation of the underlying glass slide and, consequently, the measured E_{young} value, around 4 MPa, properly characterizes the compressive modulus of this slime. Instead, for *Nostoc*, as the slime thickness is much lower (less than 20 nm), the Young modulus is very likely over-evaluated. We guess that, for *Nostoc* in low speed regime, a more realistic value of E_{young} for the slime might be in the range of few hundreds of kPa. We can thus point out that Young modulus for the *Nostoc* slime in low speed regime is roughly of the same order of magnitude when compared to that measured with non-motile (or rapidly self-immobilized) *R. wratislaviensis*. When referring to the gliding properties of these two strains as revealed by our studies, we could wonder whether the difference between their displacement speeds upon the substrate (from almost zero for *R. wratislaviensis* to 100 nm/s for *Nostoc* in slow regime) could not only be due to the excretion rate of slimes with similar compositions (from a mechanical point of view at least): slime thickness in the range of tens of nanometers for the motile *Nostoc*, up to few hundreds of nm for the self-immobilized *R. wratislaviensis*. We observed that E_{young} value for slime strongly increases when the *Nostoc* enters the fast gliding regime: the Young modulus of the slime left by the cyanobacterium is multiplied by a factor of almost 20 when comparing slow and fast gliding regimes. It could be hypothesized that the chemical nature of the excreted polymer varies depending on the bacterium speed.

We observed that the distribution of the zones of high stiffness along the longitudinal axis of the *Nostoc* is not related to the spatial periodicity of the nodules. The *Nostoc* bacterium presents zones of high stiffness much more distant, around 20 microns (see figure 8.a), than the centers of nodules (mean length of a nodule approximates 4 microns). These observations could be explained by at least the following scenarios: (i) large zones of the bacterium are coated by such a thick layer of soft polymer (ECM) that the AFM tip does not indent the underlying bacterium. So that the bacterial membrane and its higher stiffness would appear only at a restricted spots and thus generate an important roughness upon the bacterium we did not observe; (ii) the *Nostoc* is moving as a caterpillar. The *Nostoc* would retract from the sample from place to place, leading to a disruption in mechanical contact with the glass slide and consequently causing a vanishing of stiffness; (iii) a mechanical wave with an alternation of high and low stiffness zones running through the filamentous bacterium during its

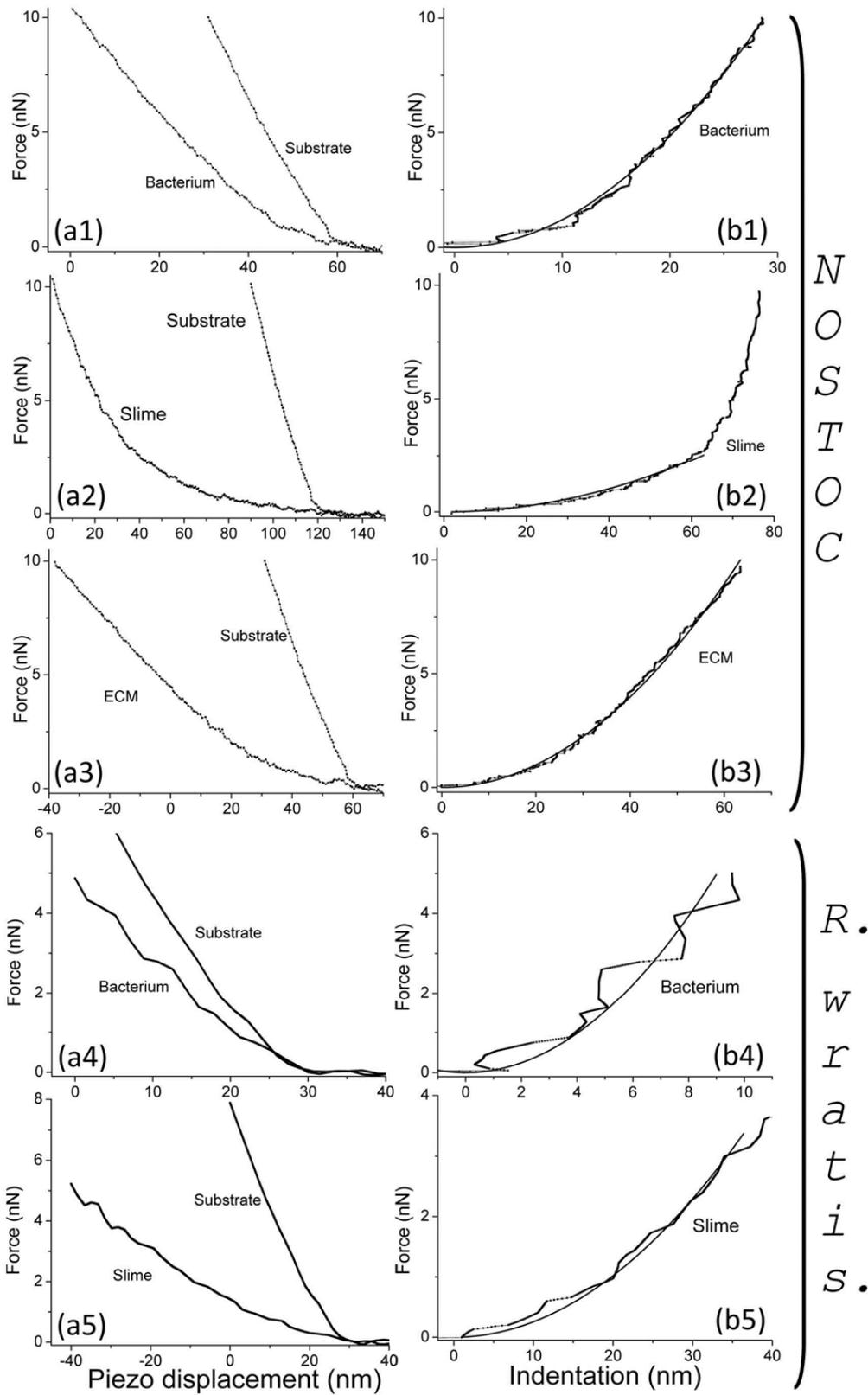


Figure 15. AFM approach and indentation curves for *Nostoc* and *Rhodococcus wratislaviensis* bacteria, ECMs and slimes. Typical curves of force versus vertical piezo displacement (a₁) and force versus indentation (b₁) for *Nostoc* bacterium (1), slime (2), ECM (3) and for *R. wratislaviensis* bacterium (4), slime (5) are plotted. Solid lines in figures (b₁) are the best fits by applying Hertz model (see main text for details). doi:10.1371/journal.pone.0061663.g015

gliding; (iv) the presence of mobile hard structures, as nucleoids, present underneath the membrane layer [44]. However as we did not measure noticeable variations of height along the nodules the two first hypotheses might be ruled out. The last one is not likely as our observations showed that the stiff structures are at a fixed position relatively to the bacterial membrane. Further investigations are in progress to elucidate that point.

Our observation on *Nostoc* about an increase of the slime thickness with the gliding speed is a point of importance as it can reveal important information about the mechanisms of gliding of living organisms. Several models for gliding of bacteria have been proposed in literature. Hoiczky and Baumeister [31] concluded, from optical and electron microscopy observations, that the extrusion of slime comes from “junctional pore complexes” in the cell wall. They indeed correlated the rate of slime extrusion with the movement speed of the cyanobacterial filaments (*Phormidium uncinatum* and *Anabaena variabilis*) and concluded that gliding movements are directly caused by the secretion of slime. A similar conclusion was drawn by Yu et al. [43] from the study of *Myxococcus xanthus* in the case of type A motile gliding. Study of *M. xanthus*, as deposited on a specially treated sample and studied by optical microscopy coupled to an enhanced ellipsometry technics [35], led to a very different conclusion. It indeed highlighted a correlation between the amount of slime deposit and the time spent by a cell at a given position, suggesting that slime is deposited at constant rate underneath the cell body regardless of its gliding speed [35]. In case of *Nostoc*, as presented in this paper (figure 14), we instead observe a significant increase of the slime thickness with the *Nostoc* gliding speed. An alternate explanation based on a fortuitous dependence between the slime thickness and the total residence time of the bacterium at one place of the sample can be very likely ruled out: a correlation between the measured speed and the local net (and unknown) residence time seems to be unlikely as we observed such a behavior for different bacteria with probably very different histories in terms of reverse movements. As a consequence the gliding process for the *Nostoc* is likely directly related to the slime extrusion process as mentioned in [31].

Conclusions

In summary, we presented results on AFM imaging of living bacteria in their genuine liquid environment and in true *in-vivo* conditions. This was feasible thanks to a non-perturbative, easy-to-apply method that avoids an external immobilization step unanimously described in literature as mandatory. This method offers an unprecedented lateral resolution and a quantization of roughness and stiffness at nanometer scales on living organisms in physiological conditions. Concerning the biological samples preparation, there is no need of mandatory and invasively drastic conditions such as fixation procedures, fluorescent-staining or enhancement of optical contrast by the use of specially designed substrate coatings as for electron or optical microscopy technics. This study was feasible thanks to the combined effects of a non-perturbing method for samples preparation and a new AFM mode [36] based on a very well controlled extend/approach curves made pixel by pixel and at a high speed. AFM parameters were optimized after several tests we made to get outstanding results on challenging samples. This AFM mode drastically minimized the lateral interactions between the cantilever and the biological organism. We studied Gram-positive, non-motile *R. wratislaviensis* strains and Gram-negative, gliding *Nostoc* cyanobacteria in their respective physiological liquid media.

On both bacterial strains height images of high quality were obtained by AFM in liquid. In particular we were able to follow the natural gliding movements of the *Nostoc* cyanobacteria both with AFM and optical imaging, directly proving the living state of the organisms during the AFM investigation and its very low impact on the biological state of the *Nostoc*. Our study revealed that AFM can image moving living species with gliding speeds as high as few hundreds of μm/h, which is unprecedented. These AFM images of gliding cyanobacteria were acquired at a high AFM acquisition rate, typically two AFM frames per minute, without limitation on spatial resolution. These breakthrough AFM observations strongly minimized perturbations on living cells when compared to common procedures based on mechanical entrapment or chemical immobilization.

Simultaneously with height data, mechanical properties of the two strains were acquired at nanometer scale. Values for stiffness, Young modulus or turgor pressure of these bacterial strains were obtained. These data revealed the presence of three main components on and around the bacteria: (i) the bacterium itself characterized by a Young modulus ranging from 104±5 MPa for Gram-positive *R. wratislaviensis* to 20±3 MPa for Gram-negative *Nostoc* at low gliding speed. In that last case the mean value of E_{Young} was shown to increase with gliding speed. Furthermore our data revealed the presence of zones with high stiffness with a spatial periodicity of about 20 microns, i.e. approximately one *Nostoc* bacterial nodule out of four. For both strains the turgor pressure varies from 50±10 to 307±20 kPa depending on the bacterium and its gliding speed; (ii) a thin layer of polymeric slime left by the bacterium during its gliding movement (*Nostoc*) or to promote its adhesion (*R. wratislaviensis*) on the surface of the glass sample. In that last case slime thickness was in the range of few hundreds of nanometers instead of few tens of nm for the gliding *Nostoc*. The Young modulus of the slime was as low as few MPa for low speed moving bacteria. We also note that the *Nostoc* slime systematically has a lower value of stiffness and larger thickness at

Table 3. Young modulus for the studied bacteria at different gliding speeds.

| Strain | Component | Gliding speed | Young modulus (MPa) |
|---------------------------|-----------|---------------|---------------------|
| <i>Nostoc</i> | Bacterium | Low | 20+3 |
| | | High | 63+5 |
| | ECM | Low | 20+3 |
| | | High | 63+5 |
| | Slime | Low | 1.1+1.0 |
| | | High | 20+3 |
| <i>R. wratislaviensis</i> | Bacterium | | 104+5 |
| | Slime | | 4.3+.5 |

doi:10.1371/journal.pone.0061663.t003

the high concavity side: we hypothesize that it could cause a dissymmetric lateral increase of the friction coefficient and a consecutive curved gliding movement. For *Nostoc* our experiments showed that the slime layer thickness is increasing with the gliding speed reinforcing Hoiczky *et al.* hypothesis [31] of a propulsion by ejection of slime; (iii) an extra cellular matrix (ECM), in case of *Nostoc* bacterium, with E_{Young} in the range of $4-15 \pm 3$ MPa depending on the gliding speed. For *R. wratislaviensis* no ECM was detected in the present operating conditions.

An important conclusion of this study is that data with an excellent quality for both height and stiffness can be obtained by AFM in liquid without the need of an artificial immobilization step of the bacteria on the sample. This opens a wide window on new studies at nanometer scale based on the dynamics of living cells in purely controlled physiological conditions: motility or adhesion processes of bacteria on solid substrates, biofilms formation, influence of light on moving properties of cyanobacteria, AFM monitoring of a biological state, effects of antibiotics on bacterial membranes and biofilm etc.

Materials and Methods

Bacterial preparation

The cyanobacterial strains used in this work were *Nostoc* strain, PCC 6720 (*Anabaenopsis circularis*) and were purchased from the Institut Pasteur Collection (CIP, Paris, France). Cyanobacteria are photoautotrophic Gram-negative prokaryotes. These strains were grown in autoclaved standard BG11 liquid medium prepared from $50 \times$ sterile-filtered concentrated cyanobacteria BG-11 freshwater solution (Sigma-Aldrich) and 18.2 M Ω .cm purified water (Milli-Q water purification system, EMD Millipore Corporation, USA). Before AFM experiments, cultures were incubated at 25°C at a constant incident flux of white light half the day in a dedicated chamber and were in contact with external air through anti-contamination filter. Bacteria were transplanted in fresh medium regularly.

The other studied strain is *Rhodococcus wratislaviensis*, capable of degrading multiple petroleum compounds in aqueous effluents and registered at the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Paris, France under number CNCM I-4088 (provided by IFPEN). Stock cultures were kept frozen at -80°C in 20% glycerol (v/v). The culture medium used was a vitamin-supplemented mineral medium (MM). This medium contained KH_2PO_4 , 1.40 g.l⁻¹; K_2HPO_4 , 1.70 g.l⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g.l⁻¹; NH_4NO_3 , 1.5 g.l⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.04 g.l⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 mg.l⁻¹. A vitamin solution and an oligo-element solution were added as previously described [65,66]. After inoculation (10%), the adequate carbon source was added, and the cultures were incubated at 30°C with constant agitation. Cultures were grown in flasks closed with a cap equipped with an internal Teflon septum to avoid any loss of substrate either by volatilization or by adsorption. The headspace volume was sufficient to prevent any O₂ limitation during growth. Growth was followed by measuring the Optical Density at a wavelength of 660 nm. Bacteria were transplanted in fresh medium once a week as stated by the results of limiting oxygen and toxicity led by the IFP.

Sample preparation

The samples we used for the AFM experiments were standard glass substrates for optical microscopy. In a first step they were cleaned by sonication in a diluted solution of detergent (pH around 9) for 15 minutes before being carefully rinsed with high

purity water (Milli-Q). Drying was done below the flux of a pure inert gas.

The bacterial suspension in its culture medium (BG 11 medium for *Nostoc* or MM medium for *Rhodococcus wratislaviensis*) was sonicated during three minutes then vortexed (two minutes) in gentle conditions. Fourty microliters (μL) were then deposited on the glass slide during the period τ_1 . The excess of solution was thereafter aspirated by a micropipette and the glass slide was further left in surrounding atmosphere (22°C and around 60% of relative humidity) for few (τ_2) minutes before being rinsed twice with 500 μL of pure water then twice with 500 μL of the appropriate culture medium in gentle conditions. The glass slide was then placed at the bottom of the liquid cell, ECCell® from JPK [36] and 500 μL of the corresponding medium were promptly poured in the liquid cell. The final bacterial surface concentration on the glass substrate for the AFM experiments was around 100 and 2.10^5 units per mm^2 in case of *Nostoc* or *R. wratislaviensis* respectively, as checked by optical and AFM microscopies. τ_1 / τ_2 respectively) was in the range of 15 minutes (5 mn respectively). The crucial step for AFM imaging in QI mode without any “external” immobilization process corresponds to the period τ_3 during which bacteria are in a special intermediate “wet-dry” state we visually checked: as soon as the dehydration front is running through the bacteria, the sample is immediately rehydrated. τ_3 is in the range of few seconds for both studied strains. As we did not check the bacterial concentration before the aspiration/refilling step, the “yield” of the self-immobilization of bacteria on the sample is unknown. To compensate the natural evaporation of the medium, we continuously supplied the ECCell in liquid medium at a rate of 100 mm^3/h by a standard syringe pump. It must be emphasized that no turbulence effects were detected. AFM measurements were made in the two hours after inoculation of the glass plate. No spontaneous detachment of bacteria from the sample towards the planktonic phase was evidenced by optical or AFM microscopy. AFM experiments were also done when liquid medium was left in a drop-form on a standard glass slide as well and similar AFM results were obtained. We think that the crucial step for the self-“immobilization” (with and without gliding according to the strains) is the time τ_3 . More detailed studies about its role in the first steps of the biofilm building are under work.

Optical and AFM imaging

Atomic force microscopy studies were carried out at a temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$ using a Nanowizard III (JPK Instruments AG, Berlin, Germany). Experiments were operated in liquid (BG11 medium and mineral medium for *Nostoc* and *R. wratislaviensis* respectively), using Quantitative Imaging® (QI) mode. QI is a force curve based imaging mode. Its main characteristic is to measure a real and complete force distance curve, at a defined constant velocity, for every pixel of the image. Vertical forces are precisely and continuously controlled during the whole approach and retract steps while imaging. Thus we got really quantitative measurements. In this mode, lateral forces applied by the apex of the AFM tip on the studied object are minimal (no pushing away or moving around of sample features). We optimized different parameters controlling this mode and, after several tests, the pixel-by-pixel extend/retract curves were done at a constant speed in the range of typically 50 500 $\mu\text{m}/\text{s}$ on a total extension of 500 nm. It corresponds to a typical indentation speed of 17 175 $\mu\text{N}/\text{s}$. An additional retract length of 100 nm was added before going to the next pixel. In case of motile bacteria as the *Nostoc* studied in this paper, we could wonder if this fast approach-retract AFM method is relevant. As a matter of fact in

our AFM experiments the indentation-like approach lasts 1 ms for a total height variation of the tip of 500 nm. At every pixel, the relevant portion of the approach curve, where the AFM tip starts to be in interaction with the substrate, is in the range of 100 nm. Thus, in case of a typical gliding speed of 200 nm/s, the bacterium moves of only 40 pm during the acquisition of AFM data for one pixel. Consequently the bacterium can be considered as immobile for every pixel of the image.

Typical images were done on the basis of a surface scanning with 128 by 128 pixels. The distance between two successive pixels along the sample surface is usually different along slow scanning axis (vertical in the reported AFM pictures) and fast scanning axis of the images. We used standard beam AFM probes (PPP-CONTPT, Nanosensors, Neuchatel, Switzerland) with a nominal value of stiffness of 0.36 ± 0.01 N/m, as measured by thermal noise [41], and a tip height of about 15 microns. The cantilever is coated by a standard 25 nm thick double layer of chromium and platinum-iridium alloy on both sides. The maximum applied force was in the range of 5–10 nN. Within this range, no major changes in the quality of AFM data were observed. No noticeable contamination of the apex of the tip was detectable (contrary to what happens when bacteria are immobilized by gelatin for example). A same cantilever was typically used few consecutive days for imaging bacteria without any noticeable deterioration.

AFM experiments with *Rhodococcus wratislaviensis* strain were replicated forty times by studying bacteria either at various locations of the same sample or for different samples built from different micro-pipetting in the available bacterial cultures. If we define a “success rate for AFM imaging” as the ratio between the number of trials for which the studied bacterium remains attached to the glass plate throughout the entire experiment and the total number of trials, then the success rate for *R. wratislaviensis* can be estimated to higher than 95%. For *Nostoc* this success rate is lower (around 50%) and may critically depend on τ_3 . When the bacteria remain on the glass plate, there were systematically gliding. As their movements upon the substrate are erratic, most of the time was spent to look for the bacterium and guess its further movements in order to place the AFM scanning window at the right position. Consequently the total number of replicates of AFM experiments for *Nostoc* was less (20) than for the non-motile bacteria. The examples detailed in this paper are typical of these studies. All the presented height AFM images are raw data (without any post-treatment as flattening, etc.). The stiffness data were calculated from the slope of the approach curves (force versus scanner elongation) at point of maximum force as averaged on a distance interval of 10 nm (as sketched in figure 2) by custom Matlab programs.

The AFM head is working on a commercial inverted microscope (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). During all the presented experiments the sample was lighted by a LED illuminating system (white light) operating in transmission mode. The optical microscope was used in bright-field conditions without any staining procedures. The samples were first screened by a LD “Plan-Neofluar” 10×/NA0.3 objective (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) and optical images, as shown in this paper, were taken through a LD “Plan-Neofluar” 40×/NA0.6 objective (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) by a standard color camera. Image analyzing was made through custom computing codes developed with Matlab R2011 (The MathWorks Company, Natick, MA, USA).

Measurement of turgor pressure

First, by considering the AFM/tip mechanical system as the association of two linear springs in series (the cantilever and the

studied sample itself) [40], we calculate the real stiffnesses of the bacterium and its components, the ECM and the slime, (k_b , k_{ECM} and k_{slime} respectively) instead of their effective values as directly deduced from raw data. These data are reported in table 1: values for effective/real stiffness are in normal/*italic* characters respectively. Getting relevant values of mechanical parameters of the bacterium and its components from real stiffness is a hard task as the indentation stiffness of the bacterium wall is governed by several terms: these associated with stretching and bending of the cell wall, terms related to the surface tension and those directly related to the turgor pressure [40], the difference in pressures between the inner and the outer part of the bacterium as delimited by the cell membranes. In one recent case [56], independent measurements of elastic modulus of the cell wall and turgor pressure of *E. coli* were done by comparing results from intact and bulging cells as obtained by using likely aggressive antibiotic agents (kanamycin and vancomycin). Mostly, by applying some hypotheses [8,40], the stiffness data taken on the bacteria are interpreted as a measurement of the turgor pressure. Thus, we derived the value of turgor pressure from the simple model introduced by Yao et al. [8]. These authors approximate the turgor pressure from a model based on tension dominated concept for the deformation of bacterial envelopes. From Boulbitch [67] and Arnoldi et al. [40] calculations on the deformation of bacterial envelopes by an AFM tip, Yao et al. [8] reduced the considerable mathematical complexity of the problem of turgor pressure calculation by elucidating some of the components that contribute to the overall deformation. Thus the turgor pressure is derived from the averaged slope (s) of the high force regime obtained from force spectrum in an identical manner to what has been done in this paper for all the so-called effective stiffness data (see figure 2). The turgor pressure is calculated from the real stiffness of the bacterium, s , by using equation (13) in reference [8]. Following parameters were used: R_b , the effective radius of the bacterium, equal 1.8 μm and r_t , the mean tip radius, $r_t = 50$ nm.

Measurement of Young modulus

The Young modulus, characterizing the elasticity of bacterial envelope, can be determined from the curve of the variation of the AFM applied force on the sample, at the low-force side, versus its indentation. This curve (see examples in figures 15.b) is obtained from the plots of the applied force during the AFM tip approach to the glass slide and the studied bacterium (figures 15.a). From the difference between this hard surface line (glass slide) and the observed deflection over the bacterium, the cell indentation is calculated. The force versus indentation curve can be analyzed through theoretical models for quantitative information on sample elasticity. In order to get an estimate of the Young modulus of the different components on and around the bacterium, we classically used the Hertz model [68]:

$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2$$

We took a Poisson coefficient, ν , equal to 0.5 and a semi-top angle, α , of the AFM tip equal to 35°.

Typical curves for the force versus piezo-displacement, for glass slide and for the different components of the bacterium, are plotted in figures 15.a. The related force versus indentation curves and the best fits using Hertz model are plotted in figures 15.b.

Acknowledgments

The authors would like to thank A. Hermsdoerfer and T. Henze (JPK Instruments AG, Berlin, Germany) for fruitful discussions. Dr. R. de Wit, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, UMR 5119, University Montpellier 2, France, and Dr. O. Brunel, Hydrosiences Montpellier, UMR 5569, University Montpellier 2, France are gratefully acknowledged for helpful discussions. A. Desoeuvre gave us an efficient technical help. The authors are very grateful to IFP Energies Nouvelles, Rueil-Malmaison, France (Dr.

Françoise Fayolle-Guichard and Yves Benoit) for the free disposal of *Rhodococcus wratislaviensis*, IFP 2016 strain, through Dr. Marie-Christine Dictor and Jean-Christophe Gourry, BRGM, Orléans, France.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM. Performed the experiments: SD CM MR. Analyzed the data: SD CM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CM. Wrote the paper: SD CM.

References

- Scheuring S (2005) Chromatic Adaptation of Photosynthetic Membranes. *Science* 309: 484–487. doi:10.1126/science.1110879.
- Dague E, Alsteens D, Latgé JP, Dufréne YF (2008) High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophysical Journal* 94: 656–660.
- Raman A, Trigueros S, Cartagena A, Stevenson APZ, Susilo M, et al. (2011) Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology* 6: 809–814. doi:10.1038/nnano.2011.186.
- Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, Belcher AM (2010) Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology* 5: 280–285. doi:10.1038/nnano.2010.29.
- Dorobantu LS, Gray MR (2010) Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning* 32: 74–96. doi:10.1002/sca.20177.
- Dupres V, Alsteens D, Andre G, Dufréne YF (2010) Microbial nanoscopy: a closer look at microbial cell surfaces. *Trends in Microbiology* 18: 397–405. doi:10.1016/j.tim.2010.06.004.
- Webb HK, Truong VK, Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP (2011) Physico-mechanical characterization of cells using atomic force microscopy - Current research and methodologies. *Journal of Microbiological Methods* 86: 131–139. doi:10.1016/j.jmimet.2011.05.021.
- Yao X, Walter J, Burke S, Stewart S, Jericho M, et al. (2002) Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 23: 213–230. doi:10.1016/S0927-7765(01)00249-1.
- Mendez-Vilas A, Diaz J, Donoso MG, Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML (2006) Ultrastructural and physico-chemical heterogeneities of yeast surfaces revealed by mapping lateral-friction and normal-adhesion forces using an atomic force microscope. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 495–509. doi:10.1007/s10482-005-9048-4.
- Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, et al. (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 110: 1349–1357. doi:10.1016/j.ultra.2010.06.010.
- Schaer-Zammaretti P, Ubbink J (2003) Imaging of lactic acid bacteria with AFM-elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 97: 199–208. doi:10.1016/S0304-3991(03)00044-5.
- Kailas L, Ratchliffe EC, Hayhurst EJ, Walker MG, Foster SJ, et al. (2009) Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes. *Ultramicroscopy* 109: 775–780. doi:10.1016/j.ultra.2009.01.012.
- Colville K, Tompkins N, Rutenberg AD, Jericho MH (2010) Effects of Polyllysine Substrates on Attached *Escherichia coli* Bacteria. *Langmuir* 26: 2639–2644. doi:10.1021/la902826n.
- Kasas S, Ikaï A (1995) A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal* 68: 1678–1680. doi:10.1016/S0006-3495(95)80344-9.
- Dufréne Y (2001) Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32: 153–165. doi:10.1016/S0968-4328(99)00106-7.
- Doktycz M, Sullivan C, Hoyt P, Pelletier D, Wu S, et al. (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97: 209–216. doi:10.1016/S0304-3991(03)00045-7.
- Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, et al. (2011) Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology* 22: 395102.
- Flemming H-C (2011) The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86: 251–259. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.025.
- Galvez ME, Beyssac O, Benzerara K, Bernard S, Menguy N, et al. (2012) Morphological preservation of carbonaceous plant fossils in blueschist metamorphic rocks from New Zealand. *Geobiology* 10: 118–129. doi:10.1111/j.1472-4669.2011.00316.x.
- Brunel O, Volant A, Gallien S, Chaumande B, Casiot C, et al. (2011) Characterization of the Active Bacterial Community Involved in Natural Attenuation Processes in Arsenic-Rich Creek Sediments. *Microb Ecol* 61: 793–810. doi:10.1007/s00248-011-9808-9.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36: 478–503.
- Busscher HJ, Weerkamp AH (1987) Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Letters* 46: 165–173. doi:10.1016/0378-1097(87)90062-0.
- Vadillo-Rodriguez V, Busscher H, Norde W, de Vries J, van der Mei H (2003) On relations between microscopic and macroscopic physicochemical properties of bacterial cell surfaces: An AFM study on *Streptococcus mitis* strains. *Langmuir* 19: 2372–2377. doi:10.1021/la020658l.
- Oxaran V, Ledue-Clier F, Dieye Y, Herry J-M, Péchoux C, et al. (2012) Pilus Biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 7: e50989. doi:10.1371/journal.pone.0050989.
- Youderian P (1998) Bacterial motility: Secretory secrets of gliding bacteria. *Curr Biol* 8: R408–R411. doi:10.1016/S0960-9822(98)70264-7.
- Adams D, Ashworth D, Nelmes B (1999) Fibrillar array in the cell wall of a gliding filamentous cyanobacterium. *J Bacteriol* 181: 884–892.
- McBride M (2001) Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55: 49–75. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.49.
- Reichenbach H (1981) Taxonomy of the gliding bacteria. *Annu Rev Microbiol* 35: 339–364. doi:10.1146/annurev.mi.35.100181.002011.
- Hanada Y, Sugioka K, Shihira-Ishikawa I, Kawano H, Miyawaki A, et al. (2011) 3D microfluidic chips with integrated functional microelements fabricated by a femtosecond laser for studying the gliding mechanism of cyanobacteria. *Lab Chip* 11: 2109–2115. doi:10.1039/C1LC20101H.
- Hoiczky E (2000) Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch Microbiol* 174: 11–17. doi:10.1007/s002030000187.
- Hoiczky E, Baumeister W (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr Biol* 8: 1161–1168. doi:10.1016/S0960-9822(07)00487-3.
- Hoiczky E, Baumeister W (1995) Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J Bacteriol* 177: 2387–2395.
- Tamulonis C, Postma M, Kaandorp J (2011) Modeling Filamentous Cyanobacteria Reveals the Advantages of Long and Fast Trichomes for Optimizing Light Exposure. *PLoS One* 6: doi:10.1371/journal.pone.0022084.
- Read N, Connell S, Adams DG (2007) Nanoscale Visualization of a Fibrillar Array in the Cell Wall of Filamentous Cyanobacteria and Its Implications for Gliding Motility. *J Bacteriol* 189: 7361–7366. doi:10.1128/JB.00706-07.
- Ducret A, Valignat M-P, Mouhamar F, Mignot T, Theodoly O (2012) Wet-surface enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. *PNAS* 109: 10036–10041. doi:10.1073/pnas.1120979109.
- JPK Instruments, (Nanowizard 3) QI mode.
- Auffret M, Labbé D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F (2009) Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl Environ Microbiol* 75: 7774–7782. doi:10.1128/AEM.01117-09.
- Bolshakova A, Kiselyova O, Filonov A, Frolova OY, Lyubchenko Y, et al. (2001) Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* 86: 121–128. doi:10.1016/S0304-3991(00)00075-9.
- Zhavnerko G, Nikolaevich Poleschuk N (2012) Mycobacterium under AFM tip: Advantages of polyelectrolyte modified substrate. *International Journal of Mycobacteriology* 1: 53–56. doi:10.1016/j.ijmyco.2012.01.009.
- Arnoldi M, Fritz M, Bauerlein E, Radmacher M, Sackmann E, et al. (2000) Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Physical Review E* 62: 1034.
- Levy R, Maaloum M (2002) Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology* 13: 33–37. doi:10.1088/0957-4484/13/1/307.
- Ulrich TA, Pardo EM de J, Kumar S (2009) The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. *Cancer Res* 69: 4167–4174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.
- Yu R, Kaiser D (2007) Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol* 63: 454–467. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05536.x.
- Longo G, Rio LM, Roduit C, Trampuz A, Bizzini A, et al. (2012) Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes. *Journal of Molecular Recognition* 25: 278–284. doi:10.1002/jmr.2171.

45. Arfsten J, Leupold S, Bradtmöller C, Kampen I, Kwade A (2010) Atomic force microscopy studies on the nanomechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79: 284–290. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.011.
46. Dufrière YF (2002) Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. *J Bacteriol* 184: 5205–5213. doi:10.1128/JB.184.19.5205-5213.2002.
47. Wright CJ, Armstrong I (2006) The application of atomic force microscopy force measurements to the characterisation of microbial surfaces. *Surface and Interface Analysis* 38: 1419–1428. doi:10.1002/sia.2506.
48. Gaboriaud F, Dufrière YF (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 54: 10–19. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.09.014.
49. Gaboriaud F, Bailet S, Dague E, Jorand F (2005) Surface Structure and Nanomechanical Properties of *Shewanella putrefaciens* Bacteria at Two pH values (4 and 10) Determined by Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 187: 3864–3868. doi:10.1128/JB.187.11.3864-3868.2005.
50. Cerf A, Cau J-C, Vieu C, Dague E (2009) Nanomechanical Properties of Dead or Alive Single-Patterned Bacteria. *Langmuir* 25: 5731–5736. doi:10.1021/la900464z.
51. Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrière YF (2008) Direct Observation of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Digestion by Lysostaphin. *J Bacteriol* 190: 7904–7909. doi:10.1128/JB.01116-08.
52. Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, Spain EM, Núñez ME (2008) Quantitative Changes in the Elasticity and Adhesive Properties of *Escherichia coli* ZK1056 Prey Cells During Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Langmuir* 24: 8102–8110. doi:10.1021/la8009354.
53. Gaboriaud F, Parcha BS, Gee ML, Holden JA, Strugnell RA (2008) Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force-volume imaging. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 62: 206–213. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.10.004.
54. Polyakov P, Soussen C, Duan J, Duval JFL, Brie D, et al. (2011) Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0018887.
55. Gaboriaud F, Gee ML, Strugnell R, Duval JFL (2008) Coupled electrostatic, hydrodynamic, and mechanical properties of bacterial interfaces in aqueous media. *Langmuir* 24: 10988–10995. doi:10.1021/la800258n.
56. Deng Y, Sun M, Shaevitz JW (2011) Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Physical Review Letters* 107: 158101–1–4.
57. Whatmore AM, Reed RH (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol* 136: 2521–2526. doi:10.1099/00221287-136-12-2521.
58. Korstgens V, Flemming H, Wingender J, Borchard W (2001) Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Methods* 46: 9–17. doi:10.1016/S0167-7012(01)00248-2.
59. Yao X, Jericho M, Pink D, Beveridge T (1999) Thickness and Elasticity of Gram-Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 181: 6865–6875.
60. Thwaites J, Mendelson N (1989) Mechanical properties of peptidoglycan as determined from bacterial thread. *Int J Biol Macromol* 11: 201–206. doi:10.1016/0141-8130(89)90069-X.
61. Mendelson N, Thwaites J (1989) Cell-wall mechanical-properties as measured with bacterial thread made from *Bacillus-subtilis*. *J Bacteriol* 171: 1055–1062.
62. Thwaites J, Surana U (1991) Mechanical-Properties of *Bacillus-Subtilis* Cell-Walls - Effects of Removing Residual Culture-Medium. *J Bacteriol* 173: 197–203.
63. Xu W, Mulhern PJ, Blackford BL, Jericho MH, Firtel M, et al. (1996) Modeling and measuring the elastic properties of an archaeal surface, the sheath of *Methanospirillum hungatei*, and the implication of methane production. *J Bacteriol* 178: 3106–3112.
64. Boal D (2012) *Mechanics of the Cell*, second edition 2012. Cambridge university press. Cambridge, UK. p.
65. Fayolle F, Hernandez G, Roux FL, Vandecasteele J-P (1998) Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl t-butyl ether (ETBE). *Biotechnology Letters* 20: 283–286. doi:10.1023/A:1005390221856.
66. Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F (2001) Biodegradation of tert-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 369–373.
67. Boulbitch AA (1998) Deflection of a cell membrane under application of a local force. *Phys Rev E* 57: 2123–2128. doi:10.1103/PhysRevE.57.2123.
68. Boulbitch A (2000) Deformation of the envelope of a spherical Gram negative bacterium during the atomic force microscopic measurements. *J Electron Microscop* (Tokyo) 49: 459–462.

Section 3 : Mesures AFM combinées à des mesures électrochimiques

1.1. Réalisation des leviers AFM-SECM par FIB (Focused Ion Beam)

Afin de combiner la microscopie à force atomique à la microscopie électrochimique, il fallait avoir un levier adapté aux mesures électrochimiques locales. Ce levier doit être fabriqué avec une très haute précision pour présenter une partie électro active bien définie et localisée.

En effet, l'extrémité de la pointe au bout du levier doit être conductrice et reliée électriquement à un contact macroscopique situé à l'autre extrémité de la plaquette porte levier (où se fait le contact par fil d'or pour liaison électrique avec le potentiostat). La liaison entre la pointe AFM et le contact macroscopique en bout de la plaquette portant le levier doit être isolée électriquement du milieu extérieur liquide. La méthode retenue est celle de la nano-fabrication par FIB (Focused Ion Beam) ou sonde ionique focalisée [16] (voir les détails dans la partie « Matériel et méthodes »).

En s'inspirant donc de ce qui était disponible dans littérature, nous avons décidé d'utiliser cette méthode de dépôt et/ou d'abrasion physique permettant de réaliser des motifs de dimensions nanométriques à micrométriques sous contrôle d'un microscope électronique combiné.

1.1.1. Essais à l'INL de Lyon

Quelques essais préliminaires ont été réalisés à l'INSA de Lyon (« Plateforme NanoLyon », INL –Institut des Nanotechnologies de Lyon- avec la collaboration de Mr. Armel Descamps et Mr David Albertini). La source disponible était le tungstène, des essais de dépôt d'un rail conducteur reliant la pointe au bout du levier AFM à l'arrière de la plaquette ont été entrepris. Cependant, au bout de ces essais, des vérifications par AFM ont démontré, qu'au lieu du dépôt voulu, le tungstène a creusé un rail, et au lieu de retrouver une surhauteur sur le profil topographique en AFM, un creux a été trouvé. Ceci est dû à la sensibilité de cette méthode et le manque de maîtrise sur ce type de support (levier AFM).

Nous nous sommes alors tournés vers l'abrasion ionique, afin de tracer par cette méthode deux tranchées parallèles sur une plaquette-levier AFM de silicium, recouverte d'une couche

d'or déposée sur un film d'accrochage en chrome pour une épaisseur totale d'environ 700 nm. Une mise au point préalable a été faite, elle nous a permis de choisir une puissance correspondant à un courant de faisceau de 1.5 nA. Nous avons ensuite vérifié, par imagerie AFM, que des tranchées ont bien été creusées (figure 77).

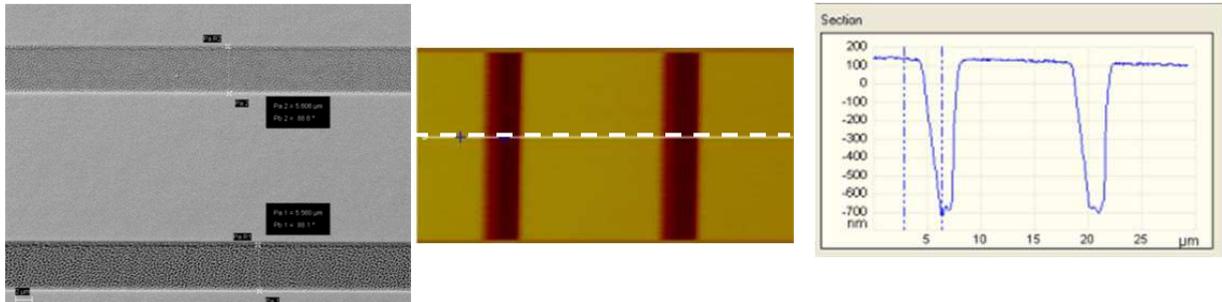


Figure 77 : Deux tranchées réalisées sur un levier. Image MEB (à gauche) ; validation par AFM : image de hauteur au milieu (largeur de l'image : 30µm). A droite profil de hauteur le long de la ligne blanche pointillée. .

Le traçage est réalisé en allant de la pointe à l'arrière de la plaquette porte levier, où se fait le contact électrique (figure 78).

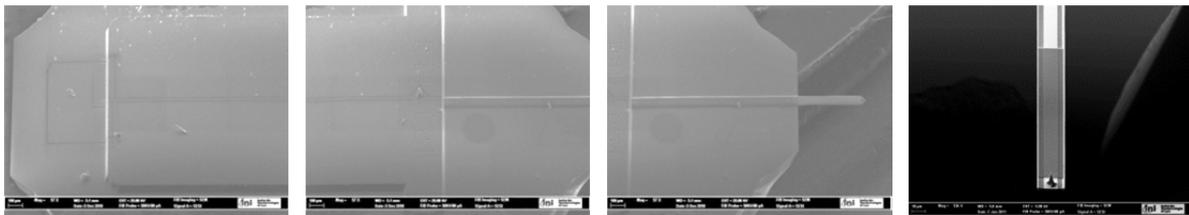


Figure 78 : circuit creusé sur l'ensemble de la plaquette-levier AFM. (images MEB)

Une deuxième étape a été le dépôt, sur la structure précédente, d'une couche d'isolant électrique d'oxyde de Silicium SiOx.

Ces étapes d'abrasion et dépôt ont été suivies par la mesure des spectres chimiques. Ainsi, un spectre EDX (Energy Dispersive X-ray spectrometry) a été réalisé afin de confirmer la présence de cette couche isolante (figure 79).

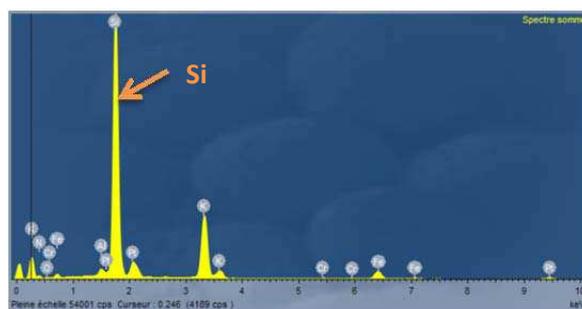


Figure 79 : Spectre EDX, avec un pic important correspondant au Silicium.

Des analyses par Conductive-AFM, sur des échantillons n'ayant pas eu de dépôt d'une sur-épaisseur de couche isolante électrique (SiO_x) ont été ensuite réalisées sur le levier ainsi modifié par FIB. Ces analyses ont montré que les deux tranchées creusées dans le levier étaient bien non conductrices. Cependant, un problème a été détecté par mesures directes (ohmmètre) sur la plaquette AFM. Il s'est avéré qu'il y avait un court-circuit : le rail central de platine était en contact électrique avec les parties latérales. Nous avons expliqué ceci par une implantation d'ions Gallium, sous les tranchées creusées.

Ceci nous a poussés à changer de méthode et à choisir une autre alternative. Celle du dépôt d'un autre matériau conducteur. Notre choix s'est porté sur le platine dont les dépôts peuvent être mieux maîtrisés. Vu l'indisponibilité de ce dernier à l'INL de Lyon, nous avons réalisé ces essais à l'IMPMC (Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés) de Paris.

1.1.2. Essais à l'IMPMC Paris

Une troisième série d'essais a donc été réalisée à l'IMPMC de Paris (avec la collaboration de Mme. Imène Estève). Elle consiste à déposer un rail de platine de $1\mu\text{m}$ de hauteur (toujours par FIB, Focused Ion Beam, dépôt par faisceau d'ions) du bout de la pointe AFM du levier jusqu'à l'arrière de la plaquette où se fait le contact électrique (figure 80). Par la suite, un dépôt de SiO_x (isolant électrique) est réalisé pour recouvrir l'ensemble.

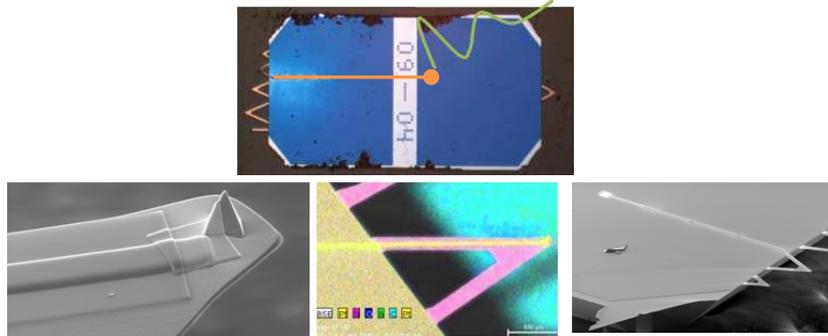


Figure 80 : Essais de dépôt de rail conducteur de platine par FIB pour réaliser des leviers SECM-AFM.

Une vérification par mesure topographique, AFM (figure 81) est réalisée afin de vérifier qu'un dépôt de platine a été bien déposé et que nous n'étions pas dans un régime d'abrasion.



Figure 81 : Mesure par AFM du profil de hauteur du rail de platine déposé par FIB, ainsi que la couche de silice.

Le profil de hauteur montre que le dépôt de platine est bien réussi, le levier AFM-SECM par dépôt de rail de platine a pu être testé et il présente bien les propriétés électriques requises (essais conductive AFM et mesures par ohmmètre).

Cette dernière série d'essais réalisée à Paris par dépôt de platine, semble plus concluante que la première, les leviers sont bien conducteurs sur le rail de platine, le contact électrique à l'arrière de la plaquette est bien fonctionnel, et tout le revêtement de SiOx isole le reste de l'ensemble du levier.

La validation électrochimique est programmée en dernière partie, au terme du projet ANR. En effet la fabrication de ces leviers a été très coûteuse en argent et en temps si bien qu'une petite quantité (5 leviers) a été fabriquée. En effet, la technique FIB permet la préparation d'échantillons dont la réalisation est difficile voire impossible par d'autres techniques. Cependant la préparation reste très délicate et se heurte à de nombreux obstacles :

- Le coût de la manipulation ainsi que la disponibilité de l'appareillage (matériel très coûteux, donc disponible dans très peu de laboratoires, carnet de réservations souvent rempli des mois à l'avance, coût de la journée de manipulation de l'ordre de 1200 euros, sans garantie de résultats).
- Technique difficile à maîtriser, exemples d'abrasion au lieu de dépôt qui ne peuvent être détectés qu'après imagerie AFM de la surface manipulée.
- L'échantillon est fragile et doit pouvoir être décollé du scotch qui le maintenait sur le support FIB sans risque de rupture du levier AFM.
- Le bombardement d'ions effectué sur la surface du levier, peut engendrer l'implantation d'ions Gallium dans les tranchées creusées, créant un contact électrique au sein de ces dernières, et rompant l'isolation électrique de la pointe.

Avant de monter ces leviers sur notre montage AFM_EC nous avons donc consacré du temps à mettre au point le protocole pour le contactage électrique vers le dispositif de mesure

électrochimique avec des leviers AFM métallisés standards. Les détails du montage réalisé sont détaillé dans la partie « Matériel et méthodes », l'électrode obtenu est conductrice sur quelques micromètres carrés.

1.2. Mesures électriques et électro-chimiques en mode approche-retrait (QI de JPK)

Nous allons maintenant décrire les résultats très récents que nous venons d'obtenir, avec notre montage expérimental, sur la détection de la présence de bactéries par des mesures électriques et électrochimiques directes (mesure du courant d'électrode via le potentiostat) ou encore via les forces d'origine électrostatique exercées par la différence de potentiel entre le levier AFM et le substrat. Nous verrons que, malgré l'utilisation de leviers conducteurs de surface électroactive de, typiquement, quelques centaines de micromètres-carré, des informations intéressantes peuvent être obtenues en milieu physiologique (force ionique élevée). Il faut noter toutefois que l'interprétation complète de ces résultats est en cours et donnera lieu à la rédaction d'un article prochainement. A la date de dépôt de ce manuscrit de thèse, seules quelques idées de base pourront être exposées.

Méthode expérimentale

Nous avons étudié les bactéries *Rhodococcus wratislaviensis* dans les conditions suivantes :

- le mode de culture a été décrit dans la section « Matériel et Méthodes » ; les prélèvements ont eu lieu alors que ces bactéries étaient en phase exponentielle de croissance. Nous avons procédé comme suit :

- Dépôt de 100 μL de suspension bactérienne pendant 15 min
- Aspiration du surplus de liquide
- 5 min à l'air libre
- Rinçage à l'eau ultra-pure puis par le milieu MM
- 500 μL de milieu MM sont versés dans la cellule

L'aspect typique de la surface du substrat vu au microscope optique en transmission est représenté sur la figure 82 : grossissement x10 (champ latéral 500 μm). Les mesures AFM sont faites aux endroits où les bactéries sont les plus distantes de leurs voisines immédiates.

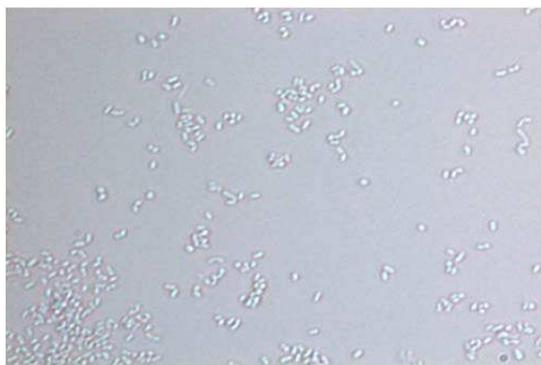


Figure 82 : Image optique d'échantillon bactérien placé dans la cellule électrochimique (grossissement 43x).

Champ de l'image $65\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$

Les expériences AFM ont lieu dans la cellule électrochimique en phase liquide. Un montage à trois électrodes a été choisi : l'électrode de travail (WE) est le levier AFM. Celui-ci (levier poutre de raideur voisine de 0.25 N/m) est métallisé par une couche mince de Pt/Ir : leviers commerciaux de chez Nanosensors (cont_Pt). La contre-électrode est la couche d'ITO déposée sur la lame de verre. Un anneau de platine sert d'électrode de référence.

Les données AFM que nous allons présenter sont brutes d'acquisition et n'ont donc subi aucun post-traitement de lissage, moyennage etc. Deux types d'expériences « électriques » ont été réalisées : (i) en mode $I(V)$ en différents endroits quasi-ponctuels du champ étudié par l'AFM et (ii) à potentiel constant sur une image complète AFM (largeur de scan de plusieurs microns). Pour ces deux techniques le temps d'intégration (moyennage) de l'intensité du courant est de 200 ms.

1.2.1. Expériences électriques en mode $I(V)$ en différents endroits quasi-ponctuels

Les études électriques ont été faites sur l'échantillon dont on voit les images AFM topographique et mécanique sur la figure 83. Ces images ont été faites en mode QI dans les conditions déjà largement décrites dans ce manuscrit : l'image AFM est décrite en mode approche-retrait pixel par pixel : l'acquisition commence par le pixel en bas à gauche pour décrire les pixels suivants, vers la droite de l'image, sur une même horizontale (axe de « scan » rapide). En fin de ligne (à la droite de l'image) l'acquisition suivante est faite sur le pixel de gauche de la ligne suivante et ainsi de suite. Pour chaque pixel le retrait de la pointe se fait sur une hauteur de 500nm avec une vitesse verticale de $125 \mu\text{m/s}$. L'approche se fait dans les mêmes conditions. Comptes-tenus des temps d'approche retrait, de déplacement d'un pixel à l'autre le temps global par pixel est de 12.3 ms. Il est à noter que ce mouvement rapide

vertical du levier AFM assure une homogénéisation du milieu liquide aux environs de la zone où se font les mesures électriques : ainsi nous pouvons considérer que les termes de convection ($\vec{v} \cdot \nabla$) et de diffusion (Δc), dans l'équation complète de Nernst-Planck [17]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla)c = -\mu \vec{\nabla} \cdot (c \vec{E}) - D \Delta c$$

qui décrit les transferts de masse des ions hydratés dans leur mouvement de ou vers la pointe AFM sont négligeables. c est la concentration des ions mobiles, μ leur mobilité, D le coefficient de diffusion et E le champ électrique subi par ces charges.

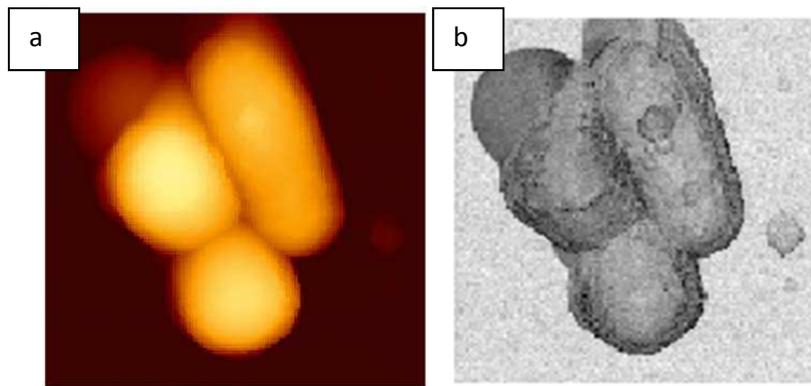


Figure 83 : Images topographique (a) et mécanique (b) ($4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$).

Nous avons ensuite travaillé sur des zones quasi-ponctuelles ($[10\text{nm}]^2$) aux trois endroits indiqués sur la figure 84. Le code de couleur sera ensuite strictement respecté : la première zone (N°1 en vert) étudiée est à la jonction entre les deux bactéries « boule » (voir figure 85 pour une image détaillée de cette jonction). La deuxième zone (N°2 en orange) étudiée est alors sur une des deux bactéries. La troisième est sur le substrat nu (N°3 en magenta). Il est utile de préciser que le levier (poutre) AFM est, par rapport aux images AFM, horizontal et sur la gauche des images. Ces images AFM sont acquises sur 128pixels par 128pixels. Il est important de noter que toutes ces images AFM ici présentées ont été acquises sans rétractation du levier AFM. La force maximale subie par levier, par rapport au niveau de force loin du substrat (mode *baseline=ON* de JPK) est imposée à 6 nN.

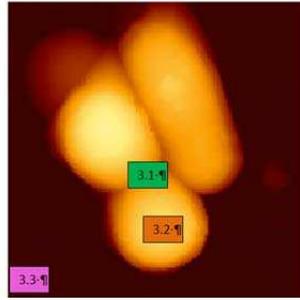


Figure 84 : Image topographique et les trois zones d'étude ($4\mu\text{m}\times 4\mu\text{m}$).

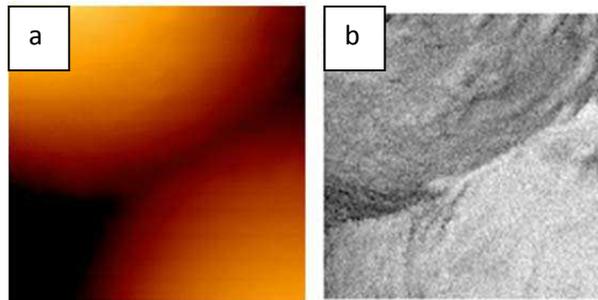


Figure 85 : Images topographique (a) et mécanique (b) de la jonction entre bactéries ($0.7\mu\text{m}\times 0.7\mu\text{m}$).

En chacune des zones est imposée une rampe de tension triangulaire entre les tensions extrémales $[-150\text{mV}; +300\text{mV}]$ comme visualisée sur la figure 86a (courbe bleue) ; le courant est tracé en vert. La courbe en rose (quasi-linéaire) représente le numéro de la ligne AFM le long de la verticale des images AFM (axe lent de balayage). La figure 86b représente les courbes $I(V)$ pour les trois positions sur l'échantillon étudiées.

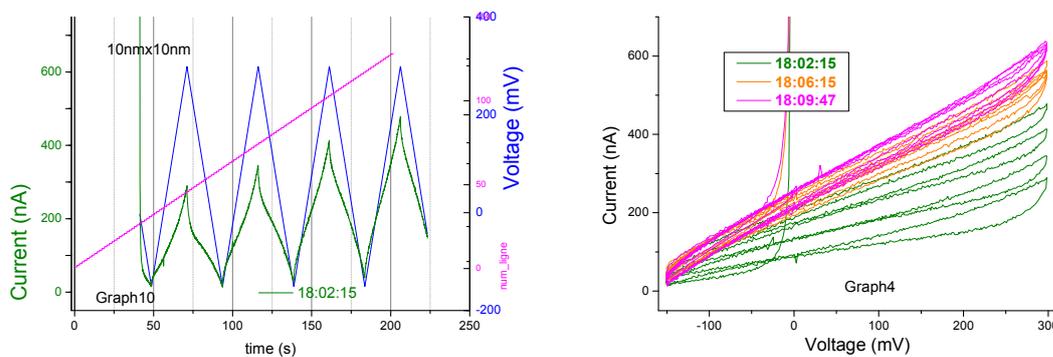


Figure 86 : (a) rampe de tension appliquée : courbe bleue ; le courant détecté est tracé en vert. (b) courbes $I(V)$ pour les trois positions étudiées (voir figure 84) sur l'échantillon : en rose, le substrat, en orange la bactérie et en vert, la jonction entre bactéries.

En chaque pixel (et donc pour une tension donnée) la courbe donnant la variation de la force imposée au levier en fonction de la distance du levier au substrat est du type de celle de la figure 87a. On reconnaît la forme caractéristique largement décrite dans les autres parties du manuscrit : une partie horizontale correspondant au niveau de force (ou au « mauvais »

réglage du faisceau laser sur la photodiode, en l'absence d'interaction) suivie d'une forte remontée quand on atteint le régime répulsif et la flexion du levier. Cette courbe (figure 87a) a été prise, au point N°1, pour une tension de 0mV. Une courbe d'approche équivalente, mais pour un potentiel de +120mV, est tracée sur la figure 87b, avec les mêmes échelles que pour la figure 87a.

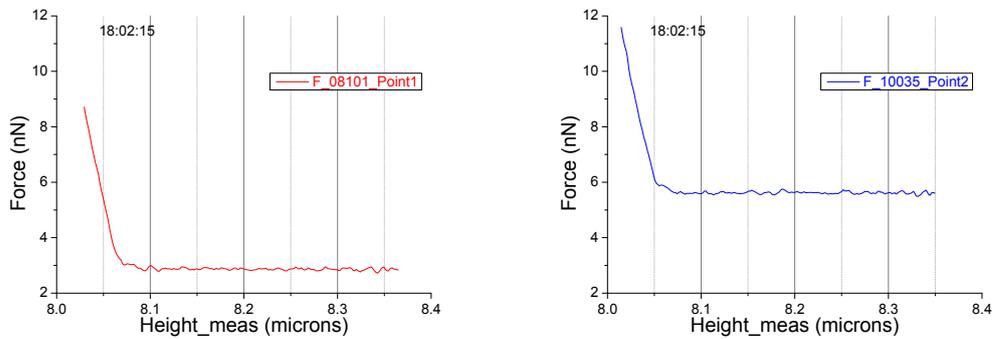


Figure 87 : $V=0\text{mV}$ (a) et $V=+120\text{mV}$ (b).

La ligne de base (pour la pointe loin du substrat : grande valeur de *Height_meas*) a vu son niveau varier : ceci est dû à la différence de force d'attraction d'origine électrostatique entre le levier et le substrat. Ce niveau a été systématiquement calculé en chaque pixel pour chacune des images AFM (points N°1 à 3) pour les courbes en approche. La variation de cette force électrostatique, à grande distance du substrat (500nm) est tracée sur la figure 88 : la figure 87a correspond au point noté « 1 » et la figure 87b à celui noté « 2 ».

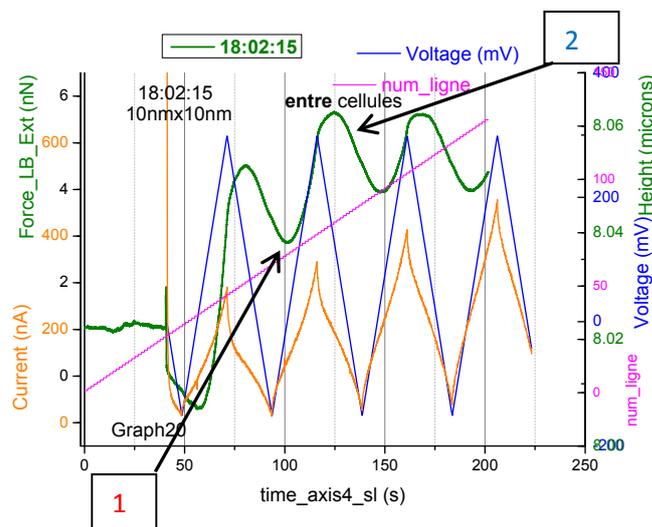


Figure 88 : ligne bleue : tension ; ligne orange : courant ; ligne verte : force électrostatique à longue distance ; ligne rose : numéro de ligne de l'image AFM. Données obtenues au point N°1.

Des données équivalentes ont été obtenues au point N°2 (figure 89) et au point N°3 (figure 90).

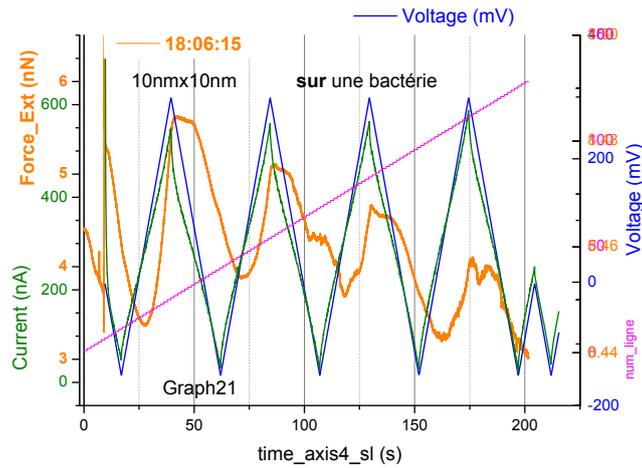


Figure 89 : ligne bleue : tension ; ligne verte : courant ; ligne orange : force électrostatique à longue distance ; ligne rose : numéro de ligne de l’image AFM. Données obtenues au point N°2.

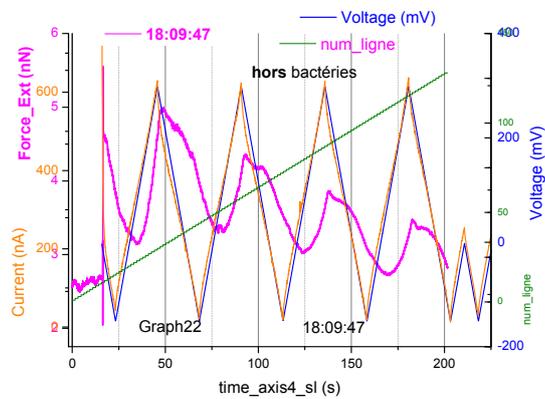


Figure 90 : ligne bleue : tension ; ligne orange : courant ; ligne rose : force électrostatique à longue distance ; ligne verte : numéro de ligne de l’image AFM. Données obtenues au point N°3.

L’ensemble de ces données sur la variation du courant et de la force électrostatique, pour ces trois points donnés, peut être tracé sur deux graphes : figure 91 pour le courant et figure 92 pour la force.

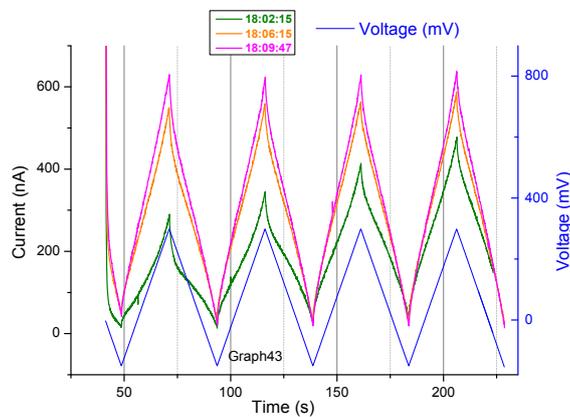


Figure 91 : Variation du courant sur les trois points étudiés (voir figure 84) : en rose, le substrat, en orange la bactérie et en vert, la jonction. La courbe en bleu est la rampe de tension imposée.

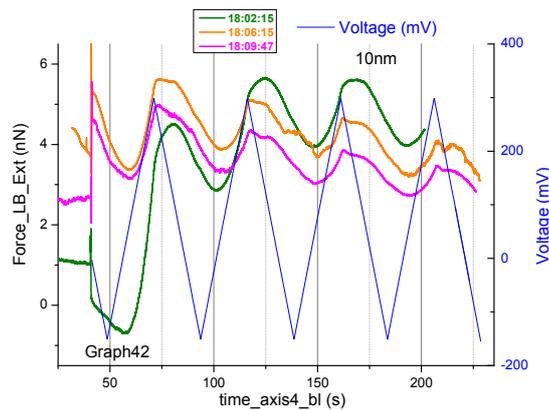


Figure 92 : Variation de la force sur les trois points étudiés (voir figure 84) : en rose, le substrat, en orange la bactérie et en vert, la jonction. La courbe en bleu est la rampe de tension imposée.

Il faut noter que, sur les figures 91 et 92, les trois courbes correspondant aux trois points d'étude (lignes verte, orange et magenta) ont été artificiellement décalées le long de l'axe des temps pour faire coïncider temporellement les démarrages de la rampe triangulaire de tension. Ce « démarrage » est clairement visible sur la force et sur le courant par le fort signal transitoire.

Par ailleurs, l'étude de ces courbes donnant la variation de l'intensité du courant ou de la force électrostatique à longue distance en fonction du temps (donc de la tension) montre que les comportements aux points sur la bactérie et sur le substrat sont voisins et différents de celui à la jonction entre bactéries.

Des informations intéressantes proviennent du signal de hauteur des images AFM. Celui-ci est obtenu à partir de la donnée de « *height_measured* » des data AFM (voir figure 84) pour la force maximale avant retrait de la pointe). Ces données sont regroupées sur la figure 93.

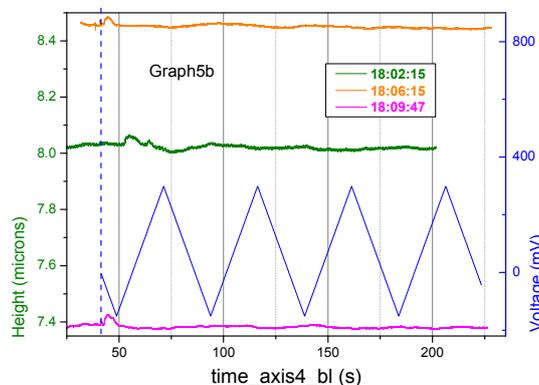


Figure 93 : Signal de hauteur des trois points étudiés.

Les trois courbes correspondent aux trois points précédemment définis sur la figure 84 et donc à des hauteurs différentes. Pour vérifier la cohérence de l'ensemble de nos données expérimentales et la très faible dérive d'une expérience à l'autre, nous pouvons tracer côte à côte deux graphes : celui (figure 94a) identique à la figure 93 et le profil de hauteur (figure 94b) pris sur l'image de $(4\mu\text{m})^2$ (voir figure 95, ligne rouge) et tracés avec les mêmes échelles verticales. L'accord est excellent.

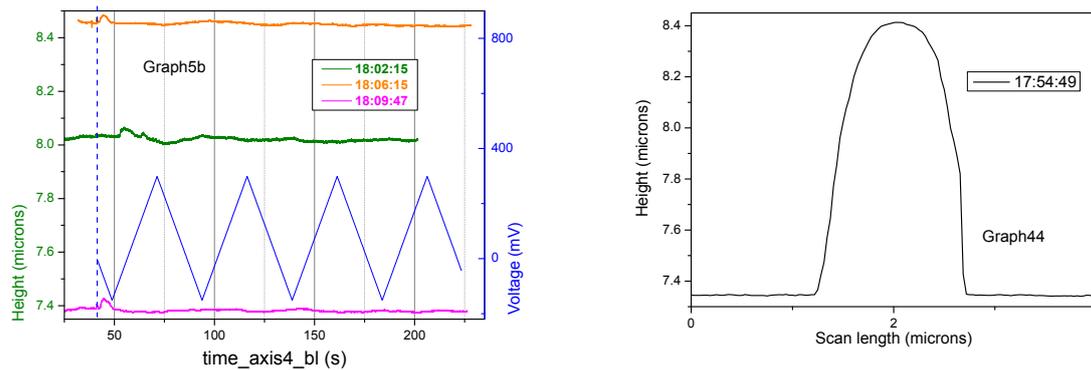


Figure 94 : La courbe de la figure 86 est reprise (a) est placée à cote du profil de hauteur de l'image des bactéries.

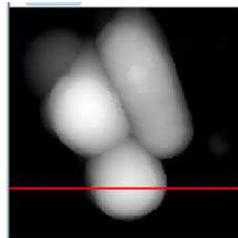


Figure 95 : Image mécanique des bactéries imagées par AFM.

Nous constatons que ces signaux de hauteur calculés pendant l'acquisition des images de $(10\text{nm})^2$ aux points N°1-3 sont constants, à l'exception de petites modulations visibles après le démarrage de la rampe de tension. Celles-ci se produisent à des temps, relativement au démarrage de la rampe de tension, variables suivant le point considéré, et donc pour des tensions différentes. L'ensemble de ces données est tracé sur la figure 96.

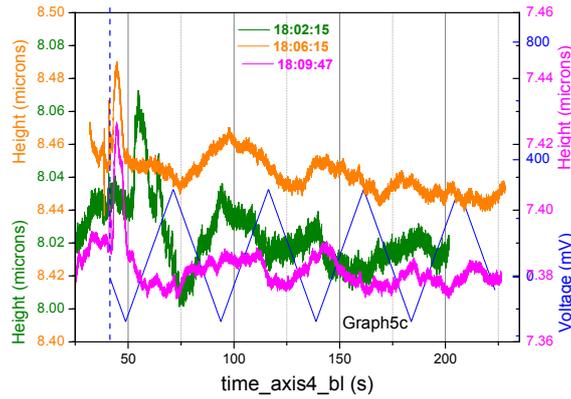


Figure 96 : Les signaux de hauteur calculés pendant les images aux trois points étudiés (voir figure 84) : en rose, le substrat, en orange la bactérie et en vert, la jonction. La courbe en bleu est la rampe de tension imposée.

Nous remarquons donc que ces modulations ont une allure très voisine de celles mesurées sur le signal de force électrostatique détecté à *grande* distance de l'échantillon (500nm). Le signal de hauteur, quant à lui, est déterminé à partir de l'allongement du piézo au moment du retrait de la pointe AFM donc dans la zone dite de « contact », au voisinage *immédiat* de l'échantillon.

La variation de ce signal de hauteur en fonction de la tension électrique appliquée entre le levier et le substrat est proportionnelle à la variation de force électrostatique entre les positions « rétractée » et « en contact » du levier comme nous pouvons le voir sur le raisonnement simplifié qui suit :

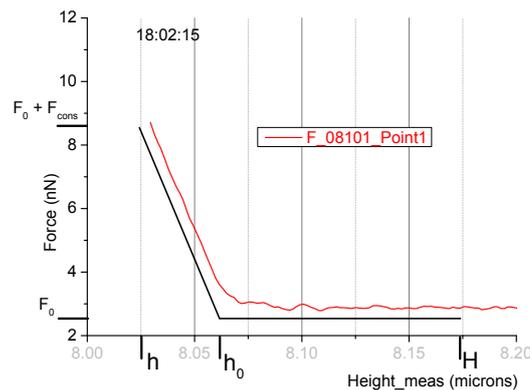


Figure 97 : Variation de la force totale ($F_{tot.}$) en fonction de l'élongation du piézo ("*Height_meas*").

En reprenant la courbe (voir figure 97) donnant la variation de la force totale (F_{tot}) en fonction de l'élongation du piézo (*Height_meas*), on peut écrire que, puisque la force totale est la somme de la force électrique (seule présente loin de la surface de l'échantillon) et de la force dite mécanique qui est d'intensité non négligeable quand $Height_meas < h_0$:

$$F_{\text{tot}}(H) = F_{\text{tot}}(h_0) = F_{\text{élec}}(H) = F_{\text{élec}}(h_0) = F_0$$

$F_{\text{tot}}(h) = F_{\text{méca}}(h) + F_{\text{élec}}(h) = F_0 + F_{\text{cons}}$ (F_{cons} est la valeur de consigne pour le pilotage de l'expérience AFM, soit ici 6nN)

Avec $h = h_0 + \delta h$

Alors :
$$F_{\text{méca}}(h_0 + \delta h) + F_{\text{élec}}(h_0 + \delta h) = F_0 + F_{\text{cons}}$$

D'où
$$F_{\text{méca}}(h_0) + \delta h \cdot F'_{\text{méca}}(h_0) + F_{\text{élec}}(h_0) + \Delta F_{\text{élec}}(h_0) = F_0 + F_{\text{cons}}$$

Avec $F_{\text{élec}}(h_0) = F_0$ et $F_{\text{cons}} \approx F_{\text{méca}}(h_0)$

Nous obtenons donc que :

$$\Delta F_{\text{élec}} = - \delta h \cdot F'_{\text{méca}}(h_0)$$

avec $F'_{\text{méca}}(h_0)$ raideur mécanique du contact au point de l'échantillon étudié.

Nous avons ainsi tracé les courbes (F_height) donnant la variation de force (liée à une variation de tension électrique) au contact pour les trois points de l'échantillon étudié sur les figures 98 à 100. Ces données peuvent être comparées à celles mesurées loin (500nm) de la surface de l'échantillon (courbes en trait noir). Des variations des signaux similaires sont observées.

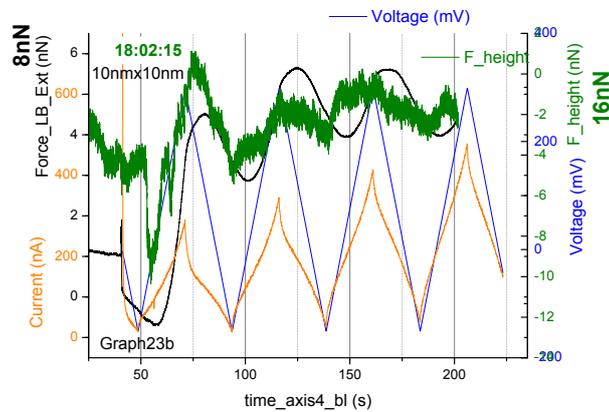


Figure 98 : Variation de force (courbe verte) au contact de l'échantillon au point 1 (figure 84). Courbe bleue : rampe de tension ; courbe orange : courant ; courbe en noir : force électrostatique à grande distance.

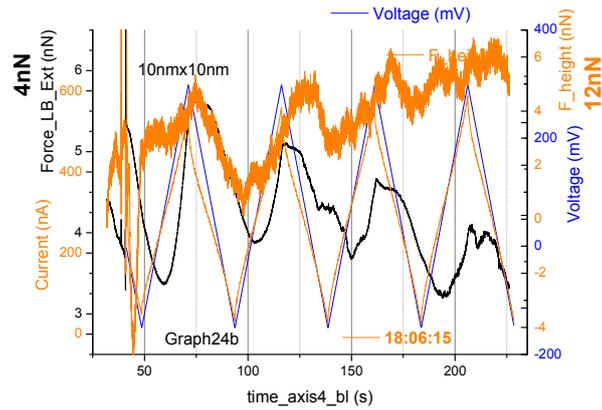


Figure 99 : Variation de force (courbe orange) au contact de l'échantillon au point 2 (figure 84). Courbe bleue : rampe de tension ; courbe orange : courant ; courbe en noir : force électrostatique à grande distance.

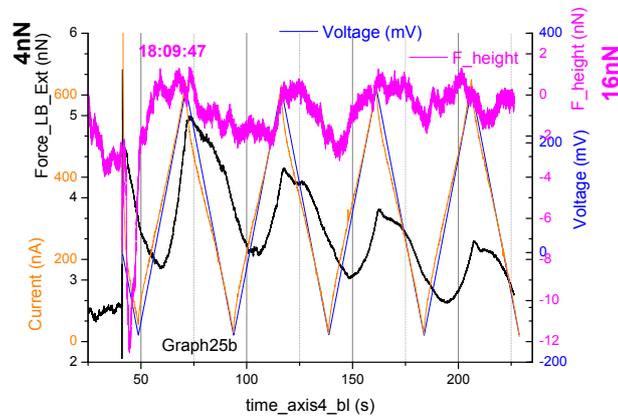


Figure 100 : Variation de force (courbe rose) au contact de l'échantillon au point 3 (figure 84). Courbe bleue : rampe de tension ; courbe orange : courant ; courbe en noir : force électrostatique à grande distance.

Il est à noter la présence, sur chacune des courbes, d'un pic de force (pour le signal F_height) dont la position en tension (voir figure 101) varie suivant le point d'étude sur l'échantillon. Ceci pourrait s'expliquer par une variation locale du potentiel de contact.

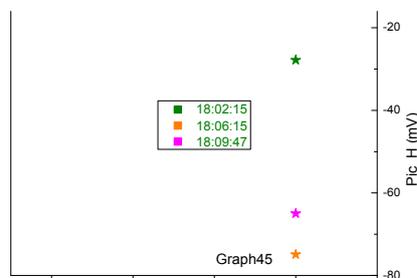


Figure 101 : Position en tension du pic de force sur les trois points étudiés.

La force électrostatique qui s'exerce entre deux électrodes (pointe/levier AFM et substrat ITO) peut s'écrire sous la forme :

$$F_{elec} = -\frac{1}{2} \cdot \frac{\partial C}{\partial z} \cdot V_{total}^2$$

avec C la capacité du système et z la distance pointe-substrat [17]. C dépend, en particulier, de la constante diélectrique locale du milieu, ϵ . V_{total} est la somme du potentiel appliqué, V , (référéncé par rapport à l'électrode de référence) et du potentiel de contact V_s . Celui-ci peut être déterminé en traçant la variation de la force électrostatique en fonction du potentiel appliqué à l'électrode. Cette variation est tracée pour plusieurs cycles I(V) successifs pour le point de l'échantillon N°1 sur la figure 102.

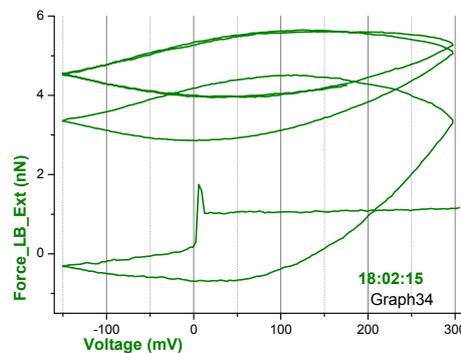


Figure 102 : Variation de la force électrostatique en fonction du potentiel appliqué à l'électrode au point étudié numéro 1.

Si on ne s'intéresse qu'au premier balayage en tension entre +300mV et -150mV on obtient la courbe de la figure 103a qui est peut être approximée, avec un très bon accord, par une parabole du type $F = A \cdot (V + V_s)^2 + F_0$. Ce traitement peut être effectué sur les deux autres cycles I(V) : voir figures 103b et 103c.

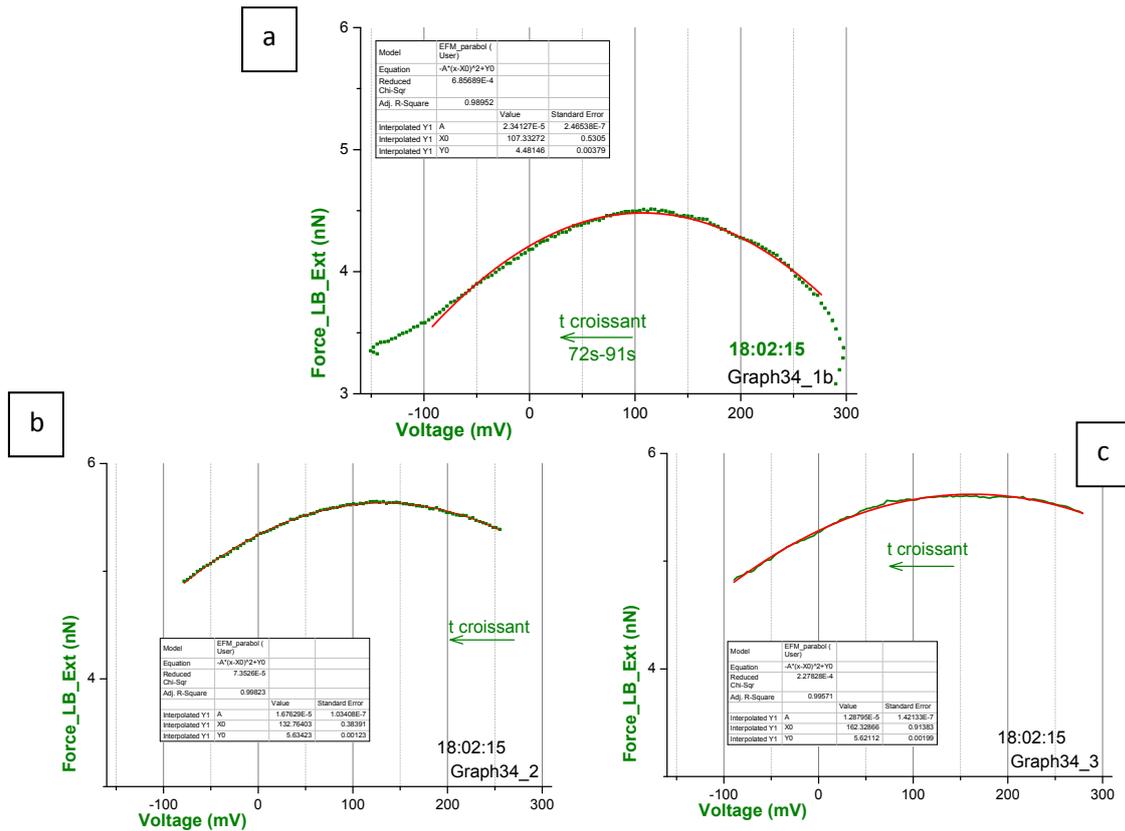


Figure 103 : Balayage en tension entre +300 mV et -150 mV (a : premier balayage, betc : les deux autres cycle (I(V)).

Il est alors possible de tracer la variation de ce potentiel de contact en fonction du numéro du cycle (figure 104).

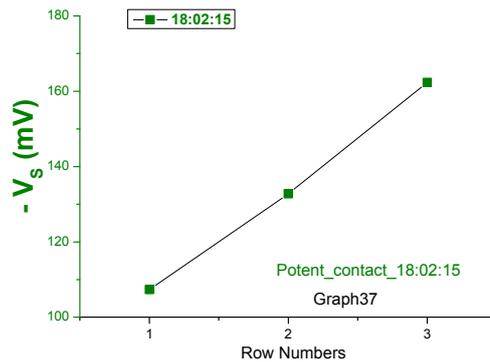


Figure 104 : Variation du potentiel de contact en fonction du numéro de cycle.

Un traitement identique peut être effectué, sur le premier balayage en tension entre +300 mV et -150 mV, aux deux autres points de l'échantillon (figure 105).

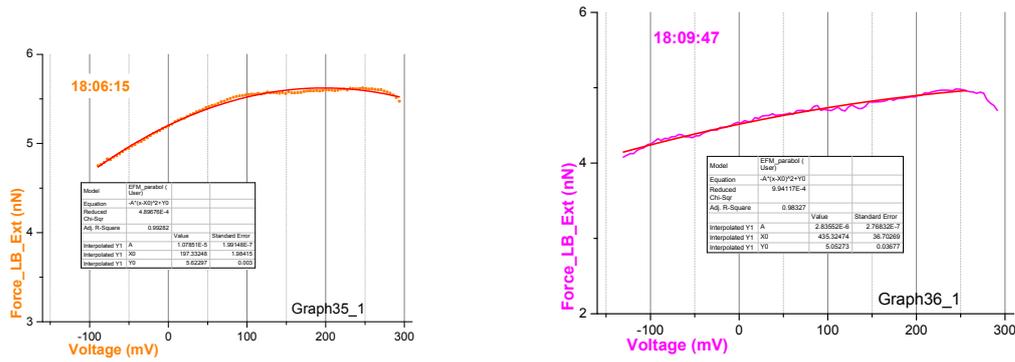


Figure 105 : Balayage en tension entre +300 mV et -150 mV aux deux autres points étudiés.

Il est possible alors de comparer (graphe de la figure 106) le potentiel de contact pour ces trois endroits de l'échantillon.

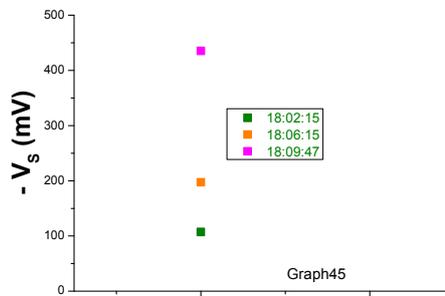


Figure 106 : Potentiel de contact au trois points étudiés sur l'échantillon.

Ces données pourraient s'interpréter par le modèle simple suivant [17]. La dépendance de cette force entre le substrat et la pointe AFM en fonction du temps résulte de phénomènes de charge à différentes constantes de temps : (i) un phénomène rapide, vraisemblablement observable à la commutation du potentiel *extérieur* à sa valeur initiale de 0mV sur les signaux de force et de courant, lié à la polarisabilité du substrat solide de nature électronique ou ionique et (ii) un phénomène lent (que nous détectons principalement) associé aux migrations ioniques dans le liquide au voisinage du substrat (ou de la pointe). En suivant le raisonnement proposé dans [17], on pourrait écrire

$$V_s = (\sigma_+ - \sigma_-) \cdot \frac{d}{\epsilon}$$
, σ_+ et σ_- étant respectivement les densités surfaciques de cations et d'anions solvatés dans une couche d'épaisseur d au voisinage de la surface solide ($d \sim 0.2$ à 0.3 nm). La figure 106 tendrait alors à montrer que la concentration en cations sur la partie bactérienne est nettement supérieure à celle sur le substrat nu et serait liée à une charge négative, sur la membrane bactérienne supérieure, importante (en valeur absolue).

1.2.2. Expériences électriques en imagerie QI à potentiel électrique constant

Les études électriques ont été faites sur l'échantillon dont on voit l'image AFM topographique ($4\mu\text{m}\times 4\mu\text{m}$) sur la figure 107 : cette étude a été faite en mode QI.

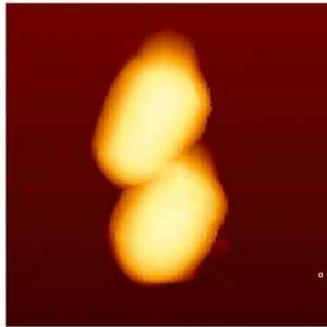


Figure 107 : Image AFM topographique de *Rhodococcus wratislaviensis* (en mode QI). Image de $(4\mu\text{m})^2$; $(128\text{ pixels})^2$; échelle verticale : $1.2\mu\text{m}$.

La tension extérieure imposée a été choisie à 0mV (par rapport à l'électrode de référence). Nous avons alors suivi la variation des signaux en fonction du temps et par conséquent de la position de la pointe AFM sur l'échantillon. Pour représenter ces données nous avons « compilé » les courbes d'approche qui ont été prises successivement en passant de pixel à pixel dans les conditions déjà décrites. Les données brutes du mode QI nous permettent en effet de connaître le temps d'acquisition de chaque point de chaque courbe d'approche par rapport à une origine commune des temps. Un exemple est visible sur la figure 108 où ont été tracées la force (trait noir) à longue distance du substrat (500nm), d'origine électrostatique, le signal de hauteur (courbe violette), sur lequel on reconnaît le fort relief (environ un micromètre de hauteur) lié à la présence d'une des bactéries, le numéro de ligne du balayage AFM (courbe magenta) et le courant électrique détecté par le levier simultanément avec la prise de données AFM. Sur la courbe de force électrostatique il est à noter la présence d'un fort signal parasite à chaque modification brusque et importante de la hauteur (donc sur les deux flancs de la bactérie).

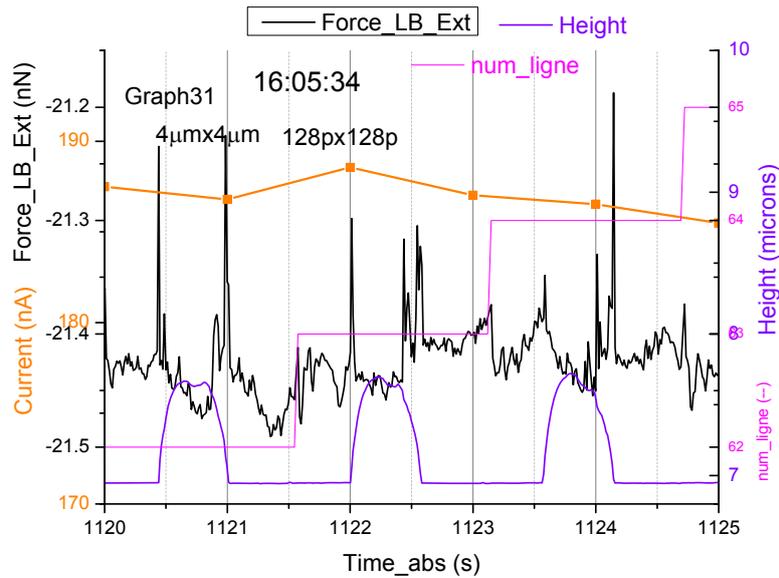


Figure 108 : La force (trait noir) à longue distance du substrat (500nm), le signal de hauteur (courbe violette), le numéro de ligne du balayage AFM (courbe magenta) et le courant électrique détecté par le levier simultanément avec la prise de données AFM.

Trois images AFM successives ont été prises avec des conditions opératoires différentes :

- la première (données de hauteur en trait bleu dans la suite) avec une largeur de scan balayage AFM de **5µm x 5µm** et une digitalisation de **64pixels x 64pixels**
- la deuxième (données de hauteur en trait rouge) avec une largeur de scan balayage AFM de **4µm x 4µm** et une digitalisation de **64pixels x 64pixels**
- la dernière (données de hauteur en trait violet) avec une largeur de scan balayage AFM de **4µm x 4µm** et une digitalisation de **128pixels x 128pixels**.

Le passage d'une image à l'autre se fait avec la pointe AFM en interaction permanente avec le substrat.

Il est important de noter que, pour ces mesures, un pixel AFM occupe une durée de *12.3ms* quelle que soit la largeur de balayage ou la digitalisation. Le signal électrique, quant à lui, est intégré sur un temps de 200ms soit l'équivalent de 16 pixels. Ceci représente une surface d'échantillon équivalente d'environ :

- 100 nm² pour l'image N°1
- 62 nm² pour l'image N°2
- 16 nm² pour l'image N°3

Les données sont visibles sur les trois figures suivantes :

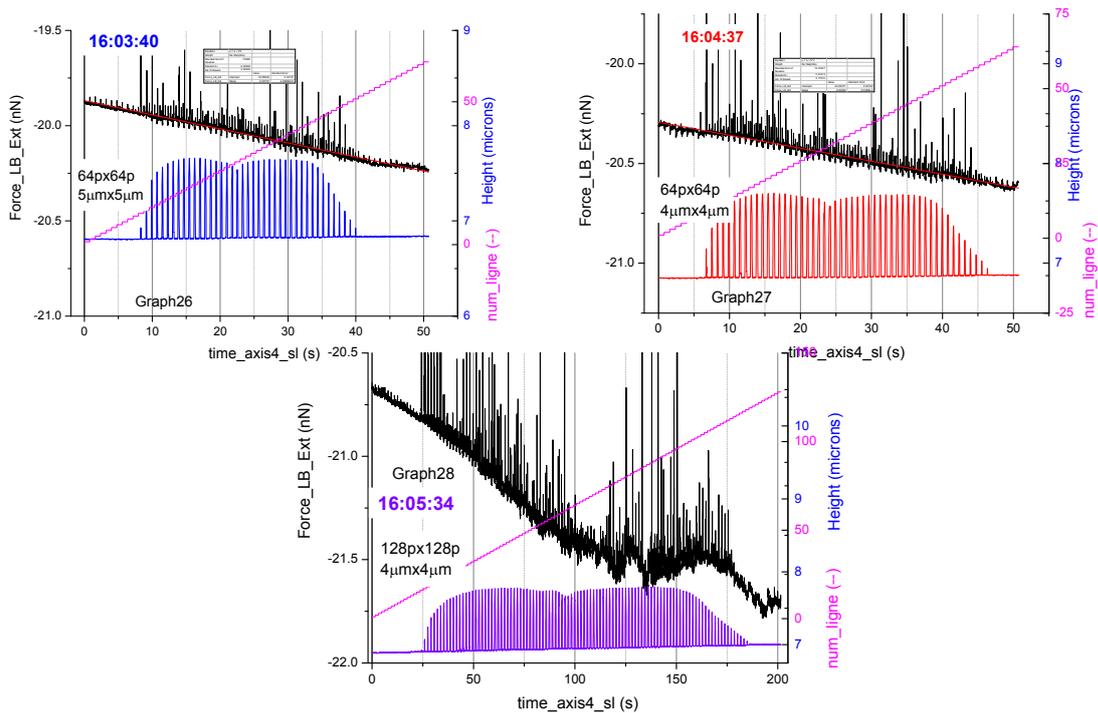


Figure 109 : Données correspondant à 3 images différentes, image 1 en bleu, image 2 en rouge et image 3 en violet (voir plus haut le descriptif des images)

Le signal de hauteur, dans les parties hors bactéries, est constant d'une image à l'autre. Par contre, la force à grande distance décroît (la force électrostatique est donc attractive et d'intensité croissante) quasi linéairement avec le temps avec une pente moyenne de -6.5 ± 0.3 pN/s. Ceci est clairement visible quand les données relatives à ces trois images successives sont tracées sur un même graphe (figure 110).

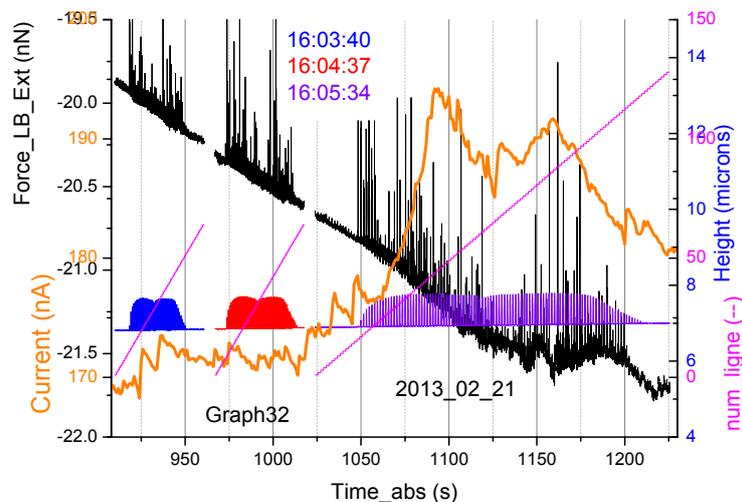


Figure 110 : Données des 3 images représentées sur un même graphe.

Sur cette même figure 110 est porté le courant électrique mesuré par notre électrode de travail, i.e. la pointe AFM. Ce courant est sensiblement constant sur les deux premières images AFM puis croît considérablement au passage sur les deux bactéries pour la *troisième* image. Compte-tenu de la convention de signe adoptée pour le courant détecté à l'électrode de travail, ce courant correspond à une récupération, par la pointe, de charges négatives que nous supposons être générées par les bactéries ici examinées. Ce courant d'électrode est associé, de manière remarquable, à une variation de la force d'interaction. Cette force tend à croître (en valeur absolue), ce qui correspondrait à une diminution de la charge de surface, récupérée par le levier AFM (et le potentiostat). Le signal électrique n'est détectable sur les bactéries que dans le cas de la troisième image. Dans ce cas, le temps de mesure du courant, par unité de surface de l'échantillon, est égal à 12.5ms au lieu de 3.2ms pour l'image N°2 et 2ms pour l'image N°1. Nous pensons donc pouvoir ainsi avoir accès à un temps typique de génération de charges par la bactérie et par unité de surface membranaire. D'autres exemples expérimentaux sont en cours d'analyse.

Références bibliographiques

1. Metzner I (1955) Chemistry and submicroscopic structure of cell walls, sheaths, and gelatin of Cyanophyceae. II. Cell morphology and cell physiology of Cyanophyceae. *Arch Für Mikrobiol* 22: 45–77.
2. Colville K, Tompkins N, Rutenberg AD, Jericho MH (2010) Effects of Poly-lysine Substrates on Attached *Escherichia coli* Bacteria. *Langmuir* 26: 2639–2644. doi:10.1021/la902826n.
3. Ivanova EP, Truong VK, Wang JY, Berndt CC, Jones RT, et al. (2010) Impact of Nanoscale Roughness of Titanium Thin Film Surfaces on Bacterial Retention. *Langmuir* 26: 1973–1982. doi:10.1021/la902623c.
4. Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, et al. (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97: 209–216. doi:10.1016/S0304-3991(03)00045-7.
5. Marbouty M (2009) Analyse de la division cellulaire de la Cyanobactérie sphérique *Synechocystis* PCC6803 Université Paris Sud - Paris XI. Available: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00553297>. Accessed 9 July 2013.
6. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86–95.
7. Schmidt R (1999) *Traité des matériaux: Tome 7, Comportements des matériaux dans les milieux biologiques : applications en médecine et biotechnologie*. PPUR presses polytechniques. 468 p.
8. Dubey GP, Ben-Yehuda S (2011) Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell* 144: 590–600. doi:10.1016/j.cell.2011.01.015.
9. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, et al. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435: 1098–1101. doi:10.1038/nature03661.
10. El-Naggar MY, Wanger G, Leung KM, Yuzvinsky TD, Southam G, et al. (2010) Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci* 107: 18127–18131. doi:10.1073/pnas.1004880107.
11. Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong M, Besenbacher F, et al. (2012) Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature* 491: 218–221. doi:10.1038/nature11586.
12. Tripathi P, Beaussart A, Andre G, Rolain T, Lebeer S, et al. (2012) Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron* 43: 1323–1330. doi:10.1016/j.micron.2012.01.001.
13. ARINERO R (2005) AFM-GENERALITES - download.php. Available: <http://mon.univ-montp2.fr/claroline/backends/download.php?url=L0FGTS1HRU5FUKFMSVRFUy5wZGY=&cidRese t=true&cidReq=NANO>. Accessed 9 July 2013.
14. Hoiczyk E, Baumeister W (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr Biol* 8: 1161–1168. doi:10.1016/S0960-9822(07)00487-3.

15. Dhahri S, Ramonda M, Marlière C (2013) In-Situ Determination of the Mechanical Properties of Gliding or Non-Motile Bacteria by Atomic Force Microscopy under Physiological Conditions without Immobilization. *PLoS ONE* 8: e61663. doi:10.1371/journal.pone.0061663.
16. Wiedemair J, Moon JS, Reinauer F, Mizaikoff B, Kranz C (2010) Ion beam induced deposition of platinum carbon composite electrodes for combined atomic force microscopy-scanning electrochemical microscopy. *Electrochem Commun* 12: 989–991.
17. Luna M, Rieutord F, Melman NA, Dai Q, Salmeron M (1998) Adsorption of Water on Alkali Halide Surfaces Studied by Scanning Polarization Force Microscopy. *J Phys Chem A* 102: 6793–6800. doi:10.1021/jp9820875.

Conclusion et perspectives

Le dispositif expérimental que j'ai contribué à mettre en place, à tester et à valider a pour but d'étudier les corrélations entre les variations de signaux électriques (détectées par des méthodes macroscopiques sur terrain) et les signaux électrochimiques locaux, à échelle microscopique, qui sont la signature de processus physico-chimiques et biologiques pilotés par les bactéries. Ce dispositif repose sur la combinaison de la microscopie à force atomique (AFM) à la microscopie électrochimique (SECM) avec un suivi optique au cours du temps.

Le développement d'un tel dispositif se heurtait d'abord à un obstacle majeur, celui de l'adaptation de l'AFM à l'étude de bactéries en milieu liquide, en les gardant dans un état proche de leur état physiologique naturel. De nombreux essais ont été réalisés, en immobilisant les bactéries à la gélatine ou à l'agar ; et ont permis d'imager des cyanobactéries dans de bonnes conditions. L'amélioration de nos protocoles, ainsi que l'acquisition d'un nouvel AFM (Nanowizard 3) doté d'un mode d'imagerie en spectroscopie de force (mode Quantitative Imaging) et l'adaptation de différents paramètres, nous a permis d'aller encore plus loin et de réussir à obtenir des résultats inédits par AFM en milieu liquide. En effet, nous avons réussi à imager différents types de bactéries, en milieu liquide, sans recourir à aucune méthode d'immobilisation. Et en nous affranchissant de cette étape, nous avons aussi imager des cyanobactéries en mouvement, par AFM ; les résultats obtenus ainsi qu'une étude mécanique et topographique de ces cyanobactéries en mouvement et d'autres bactéries ont été publiés et présentés dans ce manuscrit.

Concernant, l'association de l'AFM aux mesures électrochimiques, des leviers AFM ont été modifiés par FIB - sonde ionique focalisée-, afin d'avoir certaines propriétés sur le levier (qu'il soit conducteur uniquement sur la pointe AFM qui image l'échantillon et isolé sur tout le reste de sa surface). Des pas importants ont été réalisés dans le cadre des expérimentations que nous avons menées, ce qui n'était pas évident au départ car il existe dans ce domaine de nombreux verrous technologiques. Après plusieurs essais, la méthode de dépôt d'un rail de platine liant la pointe au point de contact à l'arrière de la plaquette où se fait le contact électrique, suivie du dépôt d'une couche isolante de SiO_x par-dessus, a été réalisée avec succès. Leur validation finale par des tests à l'échelle sub-micrométrique est planifiée pour la fin du projet ANR. Le montage expérimental a donc été mis au point, avec des leviers en platine montés sur support de verre connecté à un fil de cuivre, ce montage présente un levier

conducteur sur environ un tiers de sa partie avant. Les mesures sont ainsi effectuées dans un volume réactionnel faible (700 μL), in-situ et simultanément avec les mesures électriques et AFM : nous disposons ainsi d'un système expérimental capable d'apporter une information nouvelle sur les processus physicochimiques pilotés par les bactéries. Ce montage, et après plusieurs essais pour le réaliser minutieusement avec la quantité adéquate de composants, a été validé pour l'imagerie AFM, ce qui était une étape délicate. En effet, en ayant collé le levier au support en verre, et en apportant des éléments externes comme la colle époxy, de fortes perturbations pouvaient être apportées que ce soit chimiques (migration de composés dans le milieu réactionnel, dépôt sur les composants de l'AFM...) ou mécaniques (alourdir le levier et modifier les propriétés d'imagerie AFM, créer une surhauteur sur le levier qui entrerait en contact avec l'échantillon avant la pointe AFM ce qui rendrait impossible l'imagerie AFM...).

Concernant le suivi optique, un ensemble de programmes matlab ont été mis au point pour une prise d'image par le microscope optique au cours du temps, et leur traitement afin d'en déduire l'évolution de l'intensité lumineuse sur chaque pixel, le tout moyenné sur l'ensemble de l'image. Cette information permettant ensuite d'avoir l'évolution de la densité optique au cours du temps dans ce petit volume de 700 μL . En parallèle avec ce suivi optique, une autre méthode a été utilisée pour valider la première, celle d'un comptage direct, image par image, du nombre de cellules microbiennes sur un carré de 100 μm de côté. Cette méthode s'est révélée en parfaite corrélation avec la première, et les deux sont validées par le suivi selon la méthode classique, de mesure de densité optique par spectrophotométrie, d'un prélèvement à partir de la culture mère d'un volume de 20 mL.

L'ensemble combiné, nous a apporté une information simultanée de la topographie de l'échantillon, associée à l'évolution de la croissance bactérienne et à un signal électrochimique. L'étude de quelques exemples expérimentations, nous montre que l'ensemble est bien corrélé.

Comme suite à ce travail, l'utilisation des leviers AFM-SECM fabriqués par FIB, par dépôt de platine, dans ce montage apporterait une information plus localisée à l'échelle d'une bactérie unique. Aussi, et au terme du projet ANR (2015) des informations collectées sur colonne (50 cm), et sur terrain (plusieurs mètres) pourraient être utilisées pour les comparer à ce qui a été trouvé à l'échelle microscopique, afin de corréliser l'ensemble et avoir une approche globale multi-échelles.

Contenu

Annexes 158

 Annexe 1 159

 Annexe 2 162

 Annexe 3 167

Annexes

Annexe 1

Pointe_manuel_bact_OPT_one_file_with_save_for_article_JPK.m

```
%% CALCUL SUR DEUX IMAGES UNIQUEMENT
close all;
clear;
ind1=1;
%definition des noms de fichiers pour la lecture des images
dir_xan='Z:\JPK_data\2011_10_21\';
%pour les essais name='bact6_60microlit_bg11_QI_1-';
%name='bact5_60microlit_bg11_QI_2-'; %'bact5_60microlit_bg11_QI_-';
name='bact5_60microlit_bg11_QI_5-';
number_debut=108%86%16%78%16%180%63%89
number_fin=111%86%253%96%25%253%253%89%127%91%127
%temps_entre_image=5; %secondes
%dist_max=15; %7
xoffset=0;
yoffset=35;%25;

Nb_image=number_fin-number_debut+1;

%definition des noms de fichiers pour l'ecriture des donnees
dir_write='F:\Christian10\Manip10b_11sept15\JPK\mvt_bact_opt';
%dir_write_complet=[dir_write,'\ ',dir_xan(end-11:end-1)];
%mkdir(dir_write_complet);
%% Pour enregistrement du fichier data
dir_write_complet=[dir_write,'\ ',dir_xan(end-10:end-1),'\ ',name(1:end-1),'\manu one file\'];
mkdir(dir_write_complet);
%% Pour enregistrement des fichiers image avec pointeurs
dir_write_complet2=[dir_write,'\ ',dir_xan(end-10:end-1),'\ ',name(1:end-1),'\manu one
file\images\ ',num2str(number_debut,'%04.0f'),'_',num2str(number_fin,'%04.0f'),'\ '];
mkdir(dir_write_complet2);

%pour connaitre m et n!!
name1_debut=[name,num2str(number_debut,'%06.0f'),' .tif']; %'000888'
name1_fin=[name,num2str(number_fin,'%06.0f'),' .tif'];
Matrix1=imread([dir_xan,name1_debut]); %'lame1_000870.tif'
[m,n,p]=size(Matrix1); %jpk
%Matrix1_mod=Matrix1; %jpk
%% creation fichier
fid5 = fopen([dir_write_complet,'bilan one nodule_',name1_debut(end-9:end-4), '_ ',name1_fin(end-9:end-4),'.txt'], 'w'); %w pour ecriture

    fprintf(fid5, ' #image  p_bact_X(p)  p_bact_Y(p)  \r\n');

xbegin = xoffset+1;
xend   = size(Matrix1,2);
ybegin = yoffset+1;
yend   = size(Matrix1,1);

for ind1=1:1:2%(number_fin-number_debut+1)
```

```

%name1=[name,num2str((number_debut+1-1),'%06.0f'),'.tif']; %'000888'
if ind1==1
    name1=[name,num2str((number_debut),'%06.0f'),'.tif']; %'000888'
    name_txt=[name,num2str((number_debut),'%06.0f'),'.txt'] ;
else
    name1=[name,num2str((number_fin),'%06.0f'),'.tif']; %'000888'
    name_txt=[name,num2str((number_fin),'%06.0f'),'.txt'] ;
end

temps_im=0; %JPK

Matrix1=imread([dir_xan,name1]); %'lame1_000870.tif'

%% MODIFICATION DE LUMINOSITE ET CONTRASTE
[J_Matrix1]=modif_contraste_JPK_sub(Matrix1);
Matrix1=J_Matrix1;
%%
figure(ind1), imshow(Matrix1),title(num2str(name1)); %%?

mask = ones(m,n);
i = find(Matrix1(:, :, 2)>=0);
mask(i) = 0.5; %0.4 %0.3
%plus mask (compris entre 0 et 1) est pres de 0 plus bacterie a traiter
est "foncée"
if ind1~=1
    hold on

figure(ind1),plot(rappel_pointe(1,1)+xoffset,rappel_pointe(1,2)+yoffset,'+',
'MarkerEdgeColor','b'); axis off

figure(ind1),plot(rappel_pointe(2,1)+xoffset,rappel_pointe(2,2)+yoffset,'x',
'MarkerEdgeColor','r'); axis off
h = imshow(Matrix2);
set(h,'AlphaData',mask)
hold off

end
%hold on;

%determination des points de la bacterie mobile
[x, y] = getpts(ind1);% Coor_bact
Coor_bact=[x,y] ;
% pour afficher les X uniquement : Coor_cursor{ind1,1}(:)
% pour afficher les X et Y : Coor_cursor{ind1,1}(:, :)
%%?
[mm,nn]=size(Coor_bact);

%% Enregistrement image avec pointés
if mm~=0
    figure(ind1+1), imshow(Matrix1),title([num2str(name1),' et pointés']);
    %%?
    hold on
    figure(ind1+1),plot(Coor_bact(1,1),Coor_bact(1,2),'+',
'MarkerEdgeColor','b'); axis off
    if ind1~=1
        figure(ind1+1),plot(rappel_pointe(1,1),rappel_pointe(1,2),'x',
'MarkerEdgeColor','r'); axis off
    end
end

```

```

        saveas(ind1+1,[dir_write_complet2,name,num2str((number_debut+ind1-
1), '%06.0f'),'p.tif'],'tif');
        hold off
        close
    else
        figure(ind1+1), imshow(Matrix1),title([num2str(name1),' et pointés']);
        %%?
        saveas(ind1+1,[dir_write_complet2,name,num2str((number_debut+ind1-
1), '%06.0f'),'p.tif'],'tif');
        close
    end
    %%

    tempo=str2num(name1(end-9:end-4));

    for ii=1:mm % preparation des coordonnees des 2 nodules pour image
    suivante
        rappel_pointe(ii,1)=Coor_bact(ii,1);
        rappel_pointe(ii,2)=Coor_bact(ii,2);
    end
    % sauvegarde du 1er pointe
    if mm~=0
        fprintf(fid5, ' %4.0u %10.6e %10.6e \r\n', tempo,
Coor_bact(1,1),Coor_bact(1,2)); %+Y_pixel ici!!
    else
        fprintf(fid5, ' %4.0u %10.6e %10.6e \r\n', tempo, 0,0); %+Y_pixel
ici!!
    end

    % creation de matrice en memoire avec decalage

Matrix2 = uint8(zeros(size(Matrix1)));
Matrix2(ybegin:yend,xbegin:xend,:) = Matrix1(1:yend-yoffset,1:xend-
xoffset,:);

    %pause(1);
    close
    clear Coor_bact
    % hold off

end
fclose(fid5);
disp('*****FIN*****');
beep

```

Annexe 2

• Lecture_data_CV_Solartron

```
% Lecture_data_CV_Solartron.m

%% CALCUL SUR DEUX IMAGES UNIQUEMENT
close all;
clear;
%definition des noms de fichiers pour la lecture des images
%dir_xan='Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-04-23\Essai_zeiss-0005.tif_Files\';
%dir_xan='Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-04-25\bact02-00023.tif_Files\';

%name='DO_exp_LBpur_''LB_opto-0004' %'bact_growth_02-0008_'; LB_pur-0012_
name='DO_exp_Rhodo_cult_''DO_exp_LBpur_pointe- (5)''LB_opto-0004'
%'bact_growth_02-0008_'; LB_pur-0012_

%dir_xan=['Z:\Solartron_data\Suivi_DO_12-06-12\DO_exp',
'\',name(1:end),'\'];
dir_xan=['Z:\Solartron_data\Suivi_DO_12-06-15\DO_exp',
'\',name(1:end),'\'];

dir_write=['F:\Christian10\Manip10b_11sept15\Solartron\'];
mkdir(dir_write);
%name=[name, '_'];

%% DO_exp_LBpur__Pstat Group 1_Step01-01_Rp01.cor
step_debut=1;
step_fin=1;
    iter_debut=1%30%1;
    iter_fin=4%42%30%42%280%180%223;%212; %228;%2;
z_debut=1;
z_fin=1;
    c_debut=1;%2;
    c_fin=1;%2;

%% reduction de excursion en tension
voltage_reduc=1%1 % "1" si reduction de excursion en tension ; sinon "0"
volt_lim_max=+500 %en mV
volt_lim_min=-300 %en mV

step_image=step_fin-step_debut+1;
iter_image=iter_fin-iter_debut+1;
z_image=z_fin-z_debut+1;
c_image=c_fin-c_debut+1;

%% determination des chgts de sens de tension
% UNIQUEMENT SUR LA PREMIERE ITERATION : plus tard dans la manip du bruit
en tension apparait!!
name_txt=[name, '_Pstat Group 1_Step01-
',num2str(1, '%02.0f'), '_Rp', num2str(1, '%02.0f'), '.cor'];
fid4 = fopen([dir_xan,name_txt]); %pour lecture
    if fid4>=0
        tline = fgetl(fid4);
        count=1;
        count_line=1;
```

```

        data_extend=zeros(1,3,'double');%ca depend du nombre de
colonnes dans fichier txt; 7 ou 6aussi
        while ischar(tline) % & numel(tline)~=0
            count_line=count_line+1;

            if count_line>8
                %tline
                data_extend(count,:)=str2num(tline); %str2num
                data_extend(count,1)=data_extend(count,1).*1e+3; %
Voltage en mV
                data_extend(count,2)=data_extend(count,2).*1e+6; %
Current en nanoAMps
                count=count+1;
            else
                count=1;
            end
            tline = fgetl(fid4);
        end

    end

fclose(fid4);
%% calcul de derivee premiere
deriv_voltage_1=diff(data_extend(:,1),1);
%% operation de lissage de la cette derivee premiere de la tension
windowSize =5;
data_extend_smoothed_voltage=RankOrderFilter(deriv_voltage_1,windowSize,50)
;
%% calcul de derivee premiere de derivee premiere (smoothee) de la tension
deriv_voltage=diff(data_extend_smoothed_voltage(:,1),1);
seuil_deriv_second_pos=14;5;
seuil_deriv_second_neg=-14.5;
bon_segment_pos=find(deriv_voltage(:)>=seuil_deriv_second_pos);
bon_segment_neg=find(deriv_voltage(:)<=seuil_deriv_second_neg);
bon_segment_glo=cat(1,bon_segment_pos,bon_segment_neg);
bon_segment_glo=sort(bon_segment_glo);
[nb_points,n]=size(data_extend);
    bon_segment_glo=cat(1,1,bon_segment_glo,nb_points)
[nb_cycle,n]=size(bon_segment_glo); %11 avec notre programme "classique" ;
sinon trop de bruit sur donnees
%nb_cycle
cycle_number=1;
%pause
%% Calcul général maintenant
if voltage_reduc==0
    fid0 = fopen([dir_write,name, '_CV_f','.txt'], 'a'); %pour ecriture
    fprintf(fid0, ' Step Loop z c cycle# rev/for Voltage Current
Time_solar \r\n');
    fprintf(fid0, ' na na na na na na mV microAmp s \r\n');
    fid1 = fopen([dir_write,name, '_CV_r','.txt'], 'a'); %pour ecriture
    fprintf(fid1, ' Step Loop z c cycle# rev/for Voltage Current
Time_solar \r\n');
else
    fid0 = fopen([dir_write,name, '_CV_reduc_f','.txt'], 'a'); %pour
ecriture
    fprintf(fid0, ' Step Loop z c cycle# rev/for Voltage_red
Current_red Time_solar \r\n');
    fprintf(fid0, ' na na na na na na mV microAmp s \r\n');
    fid1 = fopen([dir_write,name, '_CV_reduc_r','.txt'], 'a'); %pour
ecriture

```

```

        fprintf(fid1, ' Step Loop z c cycle# rev/for Voltage_red
Current_red Time_solar \r\n');
end
fprintf(fid1, ' na na na na na na mV microAmp s \r\n');
for ind_step=step_debut:1:step_fin
for ind_z=z_debut:1:z_fin
for ind_c=c_debut:1:c_fin
for ind_iter=iter_debut:1:iter_fin
% bact_growth_02-0007_p000001t00000001z001c02.tif
%name1=[name,num2str((number_debut+1-1),'%06.0f'),'t.tif']; %'000888'
ind_iter
%name1=[name,'p',num2str(ind_p,'%06.0f'),'t',num2str(ind_t,'%08.0f'),'z',nu
m2str(ind_z,'%03.0f'),'c',num2str(ind_c,'%02.0f'),'t.tif'];
name_txt=[name,'_Pstat Group 1_Step01-
',num2str(ind_step,'%02.0f'),'_Rp',num2str(ind_iter,'%02.0f'),'cor'];

%%
%determination du temps d'acquisition de l'image par Zeiss
fid4 = fopen([dir_xan,name_txt]); %pour lecture
if fid4>=0
    tline = fgetl(fid4);
    count=1;
    count_line=1;
    data_extend=zeros(1,3,'double');
    while ischar(tline) % & numel(tline)~=0
        count_line=count_line+1;

        if count_line>8
            %tline
            data_extend(count,:)=str2num(tline); %str2num
            data_extend(count,1)=data_extend(count,1).*1e+3; %
Voltage en mV
            data_extend(count,2)=data_extend(count,2).*1e+6; %
Current en nanoAMps
            count=count+1;
        else
            count=1;
        end
        tline = fgetl(fid4);
    end

end

fclose(fid4);
%%

for j=2:1:(nb_cycle-2) % on ne tient pas compte de la premiere montee en
tension sur cycle 1
    data_reduced=zeros(1,3,'double');
    data_reduced_plus=zeros(1,3,'double');
    data_reduced=data_extend(bon_segment_glo(j):1:bon_segment_glo(j+1),:);
    %[mm_ext,nn_ext]=size(data_extend)
    %[mm,nn]=size(data_reduced)
    if voltage_reduc==1
        bon_segment_glo_restr=find(data_reduced(:,1)<=volt_lim_max &
data_reduced(:,1)>=volt_lim_min);% & data_reduced(:,1)<=volt_lim_min);
        [mm_restr,nn_restr]=size(bon_segment_glo_restr);
    end
end

```

```

data_reduced_plus=data_reduced(bon_segment_glo_restr(1):1:bon_segment_glo_restr(mm_restr),:);
    %size(data_reduced_plus)
    %pause
else
    data_reduced_plus=data_reduced(:,:);
    %size(data_reduced_plus)
    %pause
end

%% Operation de lissage du courant
windowSize =5;
data_smoothed=data_reduced_plus;
[mm,nn]=size(data_reduced_plus);

%data_smoothed(:,2)=filter(ones(1,windowSize)/windowSize,1,data_reduced(:,2));

%data_smoothed(:,2)=convn(data_reduced(:,2),ones(1,windowSize)/windowSize,'same');

data_smoothed(:,2)=RankOrderFilter(data_reduced_plus(:,2),windowSize,50);
    if mean(diff(data_reduced_plus(:,1),1))>0
        [C,min_max]=max(data_smoothed(1:(mm),2));
        dir_scan='f';
        fprintf(fid0, ' %u %u %u %u %u %c %10.6e %10.6e %12.2f
\r\n',ind_step,ind_iter,ind_z,ind_c,ceil(j/2),dir_scan,data_smoothed(min_max,1),data_smoothed(min_max,2),data_smoothed(min_max,3));
    else
        [C,min_max]=min(data_smoothed(1:(mm),2));
        dir_scan='r';
        fprintf(fid1, ' %u %u %u %u %u %c %10.6e %10.6e %12.2f
\r\n',ind_step,ind_iter,ind_z,ind_c,ceil(j/2),dir_scan,data_smoothed(min_max,1),data_smoothed(min_max,2),data_smoothed(min_max,3));
    end
    %min_max
    %data_smoothed(min_max,3)

end
test=0;
if test==1
    fid5 = fopen([dir_write,name, '_CV_test','.txt'], 'w'); %pour ecriture
    %fid0 = fopen([dir_write,name_txt(1:end-4), '_CV_test','.txt'], 'w');
    %pour ecriture
    fprintf(fid5, ' Step Loop z c Voltage Current Time_solar \r\n');
    fprintf(fid5, ' na na na na mV microAmp s \r\n');
    for i=1:1:mm %(count-1)
        %% fprintf(fid5, ' %u %u %u %u %10.6e %10.6e %12.2f
',ind_step,ind_iter,ind_z,ind_c,deriv_voltage(i),data_extend(i,2),data_extend(i,3));
        % fprintf(fid5, ' %u %u %u %u %10.6e %10.6e %12.2f
',ind_step,ind_iter,ind_z,ind_c,data_reduced(i,1),data_reduced(i,2),data_reduced(i,3));
        fprintf(fid5, ' %u %u %u %u %10.6e %10.6e %12.2f
',ind_step,ind_iter,ind_z,ind_c,data_smoothed(i,1),data_smoothed(i,2),data_smoothed(i,3));
        fprintf(fid5, ' \r\n');
    end
    fclose(fid5);
end

```

```
end
end
end
end
fclose(fid0);
fclose(fid1);
%ind1
%count

disp('*****FIN*****');
beep
```

Annexe 3

• Lecture_image_Zeiss

- % Lecture_image_Zeiss.m
- % run('F:\Christian10\MATLAB10\Lecture_image_Zeiss.m')
- % le 26/06/2012
- %% modif au 05/07/2012 pour corriger anomalie apparue sur
- %Z:\Zeiss_data\zeiss_2012_07_04\Rhodo-sans-electo-0003.tif_Files\Rhodo-sans-electo-0003_p000001t00000017z001c01.tif
- %% VERSION 3
- % D'apres indications de Zeiss (email du 19/juin2012: je corrige You have to use 86400 (24 * 60 * 60) instead to get the fraction in seconds
- % Le champ date en format hh:mm:ss est dans le champ <Vxxx> donne par nombre 1025 dans champ <Ixxx>1025</Ixxx> (souvent 28)
- % Le champ date en format seconde est dans le champ <Vyyy> donne par nombre 1047 dans champ <Iyyy>1047</Iyyy> (104 avant crash ordi; 99 apres)
- % Pour obtenir le temps en seconde il suffit de multiplier la valeur dans champ <Vyyy> par 24*60*60
- % "Count" donne le nombre de champ <V> <I> <A> dans le fichier (le premier champ est <I0>)
- % Attention!! L'ordre des champs <V> <I> <A> varie avec sa place dans le fichier
- % Dans fichier : indication _v3
-
- %% Version 2
- %modifie le 12/06/2012 pour tenir compte de la correction du temps donne par <V104>
- % facteur (1/coef_rectif_time_Zeiss) CE CALCUL EST FAUX (en toute rigueur)
-
-
- % le but : Faire lecture des fichiers Zeiss et calculer valeur moyenne et std des images successives prises dans un fichier
- %% CALCUL SUR DEUX IMAGES UNIQUEMENT
- close all;
- clear;
- ind1=1;
- %definition des noms de fichiers pour la lecture des images
- %dir_xan='Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-04-23\Essai_zeiss-0005.tif_Files\';
- %dir_xan='Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-04-25\bact02-00023.tif_Files\'
- name='Rhodo-sans-electo-0003' %'LB_rhodo-0003'% 'LB_opto-0004' %'bact_growth_02-0008_'; LB_pur-0012_
- %% prendre toutes les lettres jusqu'a .tif
-
- dir_xan=['Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-07-04', '\',name(1:end), '.tif_Files\']

```

• name=[name, '_'];
• %dir_xan=['Z:\Zeiss_data\zeiss_2012-05-29', '/', name(1:end-1), '.tif_Files\'];
• %name1='bact02-00023_p000001t00000004z001c01.tif';
• %name1='Essai_zeiss-0005_t2c2.tif';
• %name1='bact_growth_02-0007_p000001t00000001z001c02.tif';
•
• %Matrix1=imread([dir_xan,name1]); %'lame1_000870.tif'
• %mean2_Mat=mean2(Matrix1)
• %figure(1), imshow(Matrix1);
• %% MODIFICATION DE LUMINOSITE ET CONTRASTE
• %[J_Matrix1]=modif_contraste_Zeiss_sub(Matrix1);
• %Matrix1=J_Matrix1;
• %%
• %figure(3), imshow(J_Matrix1);
•
• %pour les essais name='bact6_60microlit_bg11_QI_1-';
• %name='bact5_60microlit_bg11_QI_2-'; %'bact5_60microlit_bg11_QI_-';
• %name='bact_growth_02-0007_';
• p_debut=1;
• p_fin=1;
•     t_debut=1%1;
•     t_fin=39%280%180%223;%212; %228;%2;
• z_debut=1;
• z_fin=1;
•     c_debut=1;%2;
•     c_fin=1;%2;
•
• % coef_rectif_time_Zeiss=1.15740815865; %étalonnage du 12/06/2012
FAUX
•
• p_image=p_fin-p_debut+1;
• t_image=t_fin-t_debut+1;
• z_image=z_fin-z_debut+1;
• c_image=c_fin-c_debut+1;
•
•
• ind1=1;
• dim_mat=p_image*t_image*z_image*c_image;
• time_value=zeros(dim_mat,1,'double');
• time_tampon=zeros(dim_mat,1,'double');
• image_value=zeros(dim_mat,2,'double');
• p_value=zeros(dim_mat,1,'uint16');
• t_value=zeros(dim_mat,1,'uint32');
• z_value=zeros(dim_mat,1,'uint16');
• c_value=zeros(dim_mat,1,'uint8');

```

```

• tab_champ=zeros(5,3,'uint16');
• %% Détermination des bons champs pour reperer la date (se fait sur
  fichier #1)
• ind_p=p_debut;
• ind_t=t_debut;
• ind_z=z_debut;
• ind_c=c_debut;
• name1=[name,'p',num2str(ind_p,'%06.0f'),'t',num2str(ind_t,'%08.0f'),'
  z',num2str(ind_z,'%03.0f'),'c',num2str(ind_c,'%02.0f'),'tif'];
• name_txt=[name,'p',num2str(ind_p,'%06.0f'),'t',num2str(ind_t,'%08.0f'
  ),'z',num2str(ind_z,'%03.0f'),'c',num2str(ind_c,'%02.0f'),'tif_meta.
  xml'];
•
• compteur=1;
• flag=0;
• fid4 = fopen([dir_xan,name_txt]); %pour lecture
•     if fid4>=0
•         tline = fgetl(fid4);
•         count=1;
•         %pause
•         while ischar(tline) %& numel(tline)>=14
•             % tline
•                 if numel(tline)>=16  &&
strcmp(tline(11:16),'Count>')
•                 count= str2num(tline(17:19));
•                 % détermination du temps à partir de date et
heure dd/mm/yyyy hh:mm:ss (souvent en <V28>)
•                 else
•                     remain = tline;
•
•                     while true
•                         [str, remain] = strtok(remain, '<>');
•                         if isempty(str), break; end
•                         %disp(sprintf('%s', str))
•                         val_champ=str2num(str);
•
•                         %% Recherche du champ xxx correspondant à
date en secondes <Ixxx>1047</Ixxx>
•                         % souvent le champ <V99/> ou <V104/>
•                         % tab_champ(i,1) : le nombre AAAA dans
<Ixxx>AAAA</Ixxx>
•                         % tab_champ(i,2) : le nombre xxxx dans
<Ixxx>AAAA</Ixxx>
•                         % tab_champ(i,3) : le nombre de digits de
l'expression (decimale) de xxxx
•                         if ~isempty(val_champ) & val_champ==1047
•                             %disp(sprintf('%s', str))
•                             tab_champ(compteur,1)=val_champ;

```

```

•         flag=1;
•     end
•     if flag && strcmp(str(1:2), '/I')
•         %disp(sprintf('%s', str))
•         val_champ=str2num(str(3:end));
•
• [caca,tab_champ(compteur,3)]=size(str(3:end));
•         tab_champ(compteur,2)=val_champ;
•         compteur=compteur+1;
•         flag=0;
•     end
•
•     %% Recherche du champ yyy correspondant à
date en format jj:mm:aaaa hh:mm:ss <Iyyy>1025</Iyyy>
•     % souvent le champ <V28/>
•     if ~isempty(val_champ) & val_champ==1025
•         %disp(sprintf('%s', str))
•         tab_champ(compteur,1)=val_champ;
•         flag=1;
•     end
•     if flag && strcmp(str(1:2), '/I')
•         %disp(sprintf('%s', str))
•         val_champ=str2num(str(3:end));
•
• [caca,tab_champ(compteur,3)]=size(str(3:end));
•         tab_champ(compteur,2)=val_champ;
•         compteur=compteur+1;
•         flag=0;
•     end
• end
• end
•     tline = fgetl(fid4);
•
•     end
•
•     end
• fclose(fid4);
• %tab_champ
• %num2str(tab_champ(2,2),'%u')
• char_date_1=12+tab_champ(1,3);
• char_date_2=12+tab_champ(2,3);
•
•
• %% Calcul general
•
• for ind_p=p_debut:1:p_fin
• for ind_z=z_debut:1:z_fin
• for ind_c=c_debut:1:c_fin
• for ind_t=t_debut:1:t_fin

```

```

• % bact_growth_02-0007_p000001t00000001z001c02.tif
• %name1=[name,num2str((number_debut+1-1),'%06.0f'),'.tif']; %'000888'
• ind_t
• name1=[name,'p',num2str(ind_p,'%06.0f'),'t',num2str(ind_t,'%08.0f'),'z',num2str(ind_z,'%03.0f'),'c',num2str(ind_c,'%02.0f'),'.tif'];
• name_txt=[name,'p',num2str(ind_p,'%06.0f'),'t',num2str(ind_t,'%08.0f'),'z',num2str(ind_z,'%03.0f'),'c',num2str(ind_c,'%02.0f'),'.tif_meta.xml'];
•
• Matrix1=imread([dir_xan,name1]);
• image_value(ind1,1)=mean2(Matrix1);
• image_value(ind1,2)=std2(Matrix1);
• p_value(ind1)=ind_p;
• t_value(ind1)=ind_t;
• z_value(ind1)=ind_z;
• c_value(ind1)=ind_c;
• %figure, imshow(Matrix1),title(num2str(name1));
•
• %%
• %determination du temps d'acquisition de l'image par Zeiss
• fid4 = fopen([dir_xan,name_txt]); %pour lecture
•     if fid4>=0
•         tline = fgetl(fid4);
•         count=1;
•         day=1;
•         %pause
•         while ischar(tline) %& numel(tline)>=14
•             if numel(tline)>=16 &&
strcmp(tline(11:16),'Count>')
•                 count= str2num(tline(17:19));
•                 % détermination du temps à partir de date et
heure dd/mm/yyyy hh:mm:ss (souvent en <V28>)
•                 %num2str(tab_champ(1,2),'%u')
•                 elseif numel(tline)>=char_date_1 &&
strcmp(tline(10:char_date_1),['<V',num2str(tab_champ(1,2),'%u'),'>'])
%14
•                     %tline(10:15)
•
• ii=strfind(tline,['</V',num2str(tab_champ(1,2),'%u'),'>']); %souvent
<V28> %02.0f
•
•                     %tline(15:(ii-1))
•                     %tline(15:16)
•
• day=str2num(tline(char_date_1+1:char_date_1+2));
•     if isempty(day)
•         beep
•         day=0;
•         month=0;

```

```

•         year=0;
•         hour=0;
•         minute=0;
•         seconde=0;
•         time_tampon_tempo=time_tampon_init;
•     else
•         %tline(18:19)
•
month=str2num(tline(char_date_1+4:char_date_1+5));
•         %tline(21:24)
•
year=str2num(tline(char_date_1+7:char_date_1+10));
•         %tline(26:27)
•
hour=str2num(tline(char_date_1+12:char_date_1+13));
•         %tline(29:30)
•
minute=str2num(tline(char_date_1+15:char_date_1+16));
•         %tline(32:33)
•
seconde=str2num(tline(char_date_1+18:char_date_1+19));
•
time_tampon_tempo=3600*hour+60*minute+seconde; % temps en secondes
•     end
•
•     if ind1==1
•         time_tampon_init=time_tampon_tempo;
•         day_tempo=day;
•         month_tempo=month;
•         year_tempo=year;
•         chgt_jour=0;
•     end
•
•     if day~=day_tempo || month~=month_tempo ||
year~=year_tempo
•         day_tempo=day;
•         month_tempo=month;
•         year_tempo=year;
•         chgt_jour=chgt_jour+1;
•     end
•     if chgt_jour==0
•         time_tampon(ind1)=time_tampon_tempo-
time_tampon_init;
•     else
•         time_tampon(ind1)=3600*24-
time_tampon_init+3600*24*(chgt_jour-1)+time_tampon_tempo;
•     end

```

```

•                                     %time_tampon(ind1)
•                                     elseif day~=0 && numel(tline)>=12+tab_champ(2,3)
&&
strcmp(tline(10:(12+tab_champ(2,3))), ['<V', num2str(tab_champ(2,2), '%u
'), '>']) %15
•
ii=strfind(tline, ['</V', num2str(tab_champ(2,2), '%u'), '>']); %souvent
<V104> ou <V99> %02.0f
•                                     %time_value(ind1)=str2num(tline(16:(ii-
1)))*1e+5; %en secondes %% Vieille correction FAUX
•
%time_value(ind1)=time_value(ind1)/coef_rectif_time_Zeiss; %% pour
avoir le vrai time %% Vieille correction FAUX
•                                     string_time=tline(13+tab_champ(2,3):ii-
1);%tab_champ(1,3)
•                                     %pause% donne une chaine ascii avec comme
"separateur" decimal une virgule --> a transformer en point
•                                     pos_comma=strfind(string_time, ',');
•                                     if isempty(pos_comma)
•                                     pos_comma=strfind(string_time, '.');
•                                     avant_comma=string_time(1:pos_comma-1);
•                                     apres_comma=string_time(pos_comma+1:end);
•                                     [m_comma,n_comma]=size(apres_comma);
•                                     else
•                                     avant_comma=string_time(1:pos_comma-1);
•                                     apres_comma=string_time(pos_comma+1:end);
•                                     [m_comma,n_comma]=size(apres_comma);
•                                     end
•
time_value(ind1)=(str2double(avant_comma)+str2double(apres_comma)*10^
(-n_comma))*24*60*60;
•                                     %% corrcetion d'un bug
•                                     elseif day==0 && numel(tline)>=12+2 &&
strcmp(tline(10:(12+2)), '<V98>') %15
•                                     ii=strfind(tline, '</V98>'); %souvent <V104>
ou <V99> %02.0f
•                                     %tab_champ(2,3)
•                                     string_time=tline(13+2:ii-1) %tab_champ(1,3)
•                                     pos_comma=strfind(string_time, ',');
•                                     if isempty(pos_comma)
•                                     pos_comma=strfind(string_time, '.');
•                                     avant_comma=string_time(1:pos_comma-1);
•                                     apres_comma=string_time(pos_comma+1:end);
•                                     [m_comma,n_comma]=size(apres_comma);
•                                     else
•                                     avant_comma=string_time(1:pos_comma-1);
•                                     apres_comma=string_time(pos_comma+1:end);
•                                     [m_comma,n_comma]=size(apres_comma);
•                                     end

```

```

•
time_value(ind1)=(str2double(avant_comma)+str2double(apres_comma)*10^
(-n_comma))*24*60*60;
•
end
•
tline(10:15)
•
% détermination du temps machine (souvent en
<V104>)
•
•
tline = fgetl(fid4);
•
•
tline(16:(ii-1))
time_value(ind1)=str2num(tline(16:(ii-
1)))*1e+5; %en secondes
time_value(ind1)-time_value(1)
tline = fgetl(fid4);
•
end
•
end
•
fclose(fid4);
•
%%
•
•
temps_im=0; %JPK
•
%pause
•
•
%% MODIFICATION DE LUMINOSITE ET CONTRASTE
•
%[J_Matrix1]=modif_contraste_Zeiss_sub(Matrix1);
•
%Matrix1=J_Matrix1;
•
%%
•
•
ind1=ind1+1;
•
•
end
•
end
•
end
•
end
•
•
dir_write=['F:\Christian10\Manip10b_11sept15\Zeiss\',dir_xan(15:end)]
;
•
mkdir(dir_write);
•
%fid0 = fopen([dir_write,name, 'data_v2','.txt'], 'w'); %pour
écriture %% pour approximation empirique FAUX
•
fid0 = fopen([dir_write,name, 'data_v3','.txt'], 'w');
•
fprintf(fid0, ' p t z c time_abs_v3 time_rel_v3 time_hh:mm:ss
mean_im std_im \r\n');
•
fprintf(fid0, ' na na na na s s s \r\n');
•
for i=1:1:dim_mat
•
fprintf(fid0, ' %u %u %u %u %14.8f %10.8f %10.1f %10.6e
%10.6e
',p_value(i),t_value(i),z_value(i),c_value(i),time_value(i),(time_val

```

```

ue(i)-
time_value(1)),time_tampon(i),image_value(i,1),image_value(i,2));
•      %   fprintf(fid0, ' %u %u %u %u %14.8f %10.8f %10.1f %10.6e
%10.6e
',p_value(i),t_value(i),z_value(i),c_value(i),time_value(i), (time_val
ue(i)-
41094,5086409277*24*60*60),time_tampon(i),image_value(i,1),image_valu
e(i,2));
•      fprintf(fid0, ' \r\n');
•  end
•  fclose(fid0);
•  disp('*****FIN*****');
•  beep

```

A mes parents,

« Nous trouverons un chemin...ou nous en créerons un. »

Hannibal (-212 avant JC)

Remerciements

Cette thèse est le fruit de longues années de travail, c'est donc avec grande émotion que je rédige ces remerciements qui marquent la fin de cette aventure enrichissante.

*Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur de thèse Mr **Christian Marlière**, Directeur de recherche CNRS, pour m'avoir confié ce travail, ainsi que pour son aide précieuse, son encadrement efficace, son soutien permanent, sa grande rigueur ainsi que son impressionnante capacité de travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés, il a su me guider tout en me laissant une grande liberté et en me déléguant plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur. Remercier son directeur de thèse est pour certains une formalité, ici c'est très sincère, car il a été beaucoup plus qu'un directeur de thèse (je n'oublierai pas les boîtes de macarons sur mon bureau à chaque anniversaire...).*

*Je remercie également Mr **Michel Ramonda**, ingénieur de recherche, pour l'hospitalité dont il a fait preuve en m'accueillant à la centrale de technologie en micro et nanoélectronique, et qui m'a tout appris de la microscopie à force atomique (AFM). Je lui adresse aujourd'hui ma gratitude pour sa sympathie, sa gentillesse, sa disponibilité, ses idées, ses conseils qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse; merci aussi de m'avoir fait l'honneur et le plaisir de participer au jury de soutenance.*

Je ne sais comment exprimer ma gratitude sincère à ces deux personnes autrement qu'en leur promettant de travailler avec autant de sérieux et de me comporter comme eux avec de futurs étudiants dans ma situation, si un jour l'occasion m'en est donnée.

Mes vifs remerciements vont à Mr Etienne Dague, chargé de recherche CNRS de l'Université Toulouse 3, et Mr Grégory Francius, chargé de recherche CNRS de l'Université de Lorraine, pour avoir accepté d'évaluer ce travail doctoral, en tant que rapporteurs. Je remercie également Mme Touria Cohen-Bouhacina, Professeur à l'Université Bordeaux 1 et Mr Rutger De Wit, Directeur de recherche CNRS de Université Montpellier 2 d'avoir accepté de participer à ce jury comme examinateur. Je remercie enfin Mr Jean Christophe Gourry, ingénieur au BRGM d'Orléans, d'avoir accepté de participer au jury et de l'intérêt qu'il avait pour mon travail en sa qualité de coordinateur du projet ANR BioPHY.

J'adresse aussi ma gratitude à Mr Philippe Pezard, directeur de l'équipe « Transferts en milieu poreux » pour m'avoir ouvert les portes de l'équipe à mon arrivée, alors appelée « subsurface », et Mr Philippe Gouze directeur actuel; j'ai apprécié leur accueil chaleureux, leur enthousiasme et leurs encouragements. Merci également à Mr Serge Lallemand, directeur du laboratoire Géosciences à mon arrivée (et membre de mon comité de thèse) et Mr Jean-Louis Bodinier, directeur actuel, pour leur accueil, disponibilité à chaque sollicitation et les conditions de travail privilégiées qu'ils m'ont offert et qui ont été essentielles pour le bon déroulement de mes travaux de recherche.

Aussi, ce travail n'aurait pu être mené sans l'aide de différents financeurs : le CNRS et la région Languedoc Roussillon pour le financement de mon allocation de recherche ; l'ANR (programme ECOTECH 2011) pour le soutien financier ayant permis d'acquérir le matériel scientifique sur lequel j'ai principalement travaillé.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont contribué au savoir-faire acquis tout au long de cette thèse, tout d'abord, Mr David Albertini et Mr Armel Descamps de la plateforme

Nanocaractérisation de l'INSA de Lyon pour les essais menés par sonde ionique focalisée, pour leur grande disponibilité et leur bonne humeur, ainsi que Mr Philippe Leclerc pour les retrouvailles au forum et les messages d'encouragements. Ensuite, Mme Françoise Fayolle-Guichard et Mr Yves Benoît pour leur accueil à l'Institut Français du Pétrole et Energies Nouvelles et les souches qu'ils nous ont généreusement confiées. A Mme Marie Christine Dictor, Caroline Michel et Hafida Tris du BRGM d'Orléans, pour leur accueil, leurs conseils, avis et aide précieuse. Enfin à Mr Frédéric Kanoufi, qui m'a initié à l'électrochimie au sein de l'ESPCI ParisTech, ses connaissances détaillées m'ont permis d'améliorer la qualité de ma recherche, je le remercie pour son accueil et aide que ce soit à Paris ou à l'occasion des comités de thèse dont il était membre.

Je remercie également le reste des membres du comité de thèse, en plus de Mr Lallemand et Mr Kanoufi, à savoir Mme Véronique Naudet et Mr Frédéric Garabetian, pour l'intérêt porté à ce travail, les remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse.

Du côté de Montpellier, je tiens à exprimer ma gratitude à Mme Odile Bruneel et Mme Angélique Desoeuvre d'HSM, pour leur grande aide logistique; au personnel de l'école doctorale SIBAGHE, en particulier Mme Joelle Lopez qui a été disponible jusqu'au bout.

Au sein de mon laboratoire « Géosciences », j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes issues de disciplines variées qui ont participé de près ou de loin à ce travail et aux quelles je suis très reconnaissante. Tout d'abord les doctorants du bâtiment 22, spécialement Aida, bouffée d'air frais venant de Tunisie, pour toutes les séances de rires et discussions autour d'un café. A Bernadette (pour sa bonne humeur permanente et son efficacité), Sylvie (pour les articles qu'elle arrive à retrouver miraculeusement), aux gestionnaires Eliane, Céline et Patrice, à Anne, Fati, à Jean, Stéphane, Mitch, Jean-Jacques, Fabrice... et à tous les chercheurs de GM j'adresse les remerciements de l'extraterrestre en blouse blanche que j'étais parmi tous ces géologues.

Au sein de l'équipe TMP, composée de chercheurs dont je tiens à souligner, au-delà des nombreuses qualités scientifiques et techniques, les grandes qualités humaines, j'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, tout d'abord parmi les collègues de bureau (doctorantes à mon arrivée et docteurs aujourd'hui) Vanessa (pour son sourire qui m'a tout de suite rassurée, sa bienveillance et tous les repas et sorties partagés), Marie (pour son énergie et les invitations à Rome que je n'ai pas pu satisfaire à cause de la thèse, un de ces jours on aura le temps de se faire un séjour ensemble !) et Charlotte (pour sa bonne humeur et énergie) merci les filles de m'avoir accueillie chaleureusement, m'avoir aidé dans « mes premiers pas »... Je remercie également les autres collègues de bureau qui se sont succédé, Alexandra, Omar, Ismaël, Aurélie et Sinda, merci pour votre bonne humeur et les encouragements même à distance après votre départ. Merci aussi à Jehanne et Agathe pour les conversations autour d'un bon repas (et l'échange de recettes :), les encouragements et les sorties shopping-cupcake improvisées... Enfin, merci à Nataliya que je pourrais remercier pendant de deux pages tant elle a été présente pour moi dans les bons moments comme les moments plus difficiles, dans les trajets quotidiens avec en option les départs tardifs et les samedis au bureau, pour toutes les petites attentions les jours où je suis dépassée par la quantité de travail à faire, les cadeaux de l'Ukraine et les fou rires... Merci de m'avoir aidé et encouragé et de m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin !

Je remercie tous les autres membres de l'équipe TMP du côté du bâtiment 22, Stéphanie (et sa bonne humeur contagieuse), Muriel (pour son sourire et son chariot :), Didier (pour ses encouragements), Bernard (pour ses visites du couloir en fin de journée pour des discussions passionnantes), Benoit (pour sa bienveillance), Gilles (pour sa personnalité en or et sa

grande culture), Johanna (pour son enthousiasme), Joëlle (pour les gouters de 16h.), sans oublier l'équipe coté MSE, Linda (pour sa compagnie précieuse à San Francisco), Olivier (pour sa bonne humeur), Gérard et Richard (pour leurs encouragements) et nos nouveaux docteurs Ousmane et Halidi (et oui c'est mon tour !). Vous êtes tous des collègues hors pair !

Du côté de la vie montpelliéraine, et parce qu'il est bon d'être épaulé pendant toute cette période de travail, ponctuée çà et là de stress, surtout à la fin; je pense à tous mes amis rencontrés ici, spécialement Souhir, Salma, les deux également en thèse et à même de comprendre mes angoisses, ainsi que Asma, Feriel et Azza, merci les filles pour tous les moments partagés, vous avez égayé ces années, vous êtes formidables ! Merci à tous les amis exceptionnels rencontrés pendant ces années, Imed musicien talentueux qui nous arrache à notre « quotidien de scientifiques » pour de magnifiques soirées, Massimo, Hedi, Mouna, Ghazi, Khalil, Selim, Alia, Fethi, Amine, Anis, Yosr, Emna, Asma, Tala, Eloise, Leila, Karima, Haki, Ashref, Olivier, David... Un simple merci ne suffirait pas à exprimer ma gratitude envers tous ces moments passés à vos côtés. Vous allez me manquer ! Je pense également à tous les amis rencontrés tout au long des stages en France, particulièrement à Sarah Jiménez, Meriam et Radhouane (Rado).

Cette thèse étant un Aboutissement, je voudrais remercier chaleureusement ceux qui m'ont donné gout au savoir de l'école Sidi Sabeur de la medina de Tunis et au lycée Essalem de Boumhal, spécialement à Mme Massoudi, Mr Hadad, Mme Toumi et Mr Ziouziou, par ce que vous étiez différents de tous les autres... Je ne serais sûrement pas en train d'écrire des remerciements de thèse si nos chemins ne s'étaient pas croisés. Merci également à mes Profs de INSAT, Mr Fattouch, Mr Abidi, et de l'INPL Mr Ghoul qui encore aujourd'hui m'épaulent et m'encouragent.

Je voudrais remercier mes amies de toujours Nesrine et Sonia, on a été sur trois continents différents ces trois dernières années (Amérique, Europe et Afrique) mais vos attentions et messages d'encouragement étaient là, je suis fière de vos réussites et j'espère qu'on se réunira très vite pour rattraper le temps perdu. Merci à Ghada, Salma et Rim, mes grandes sœurs par adoption, et merci à « Awled el houma », Samy, Nizar, Maher, Ilyes, Slim, Wessim... votre humour est tout simplement introuvable ailleurs. Je pense également à mes amies de la fac, Emna qui a été là pour les stages de Cognac, Bourg en Bresse et Nancy, le démarrage de cette thèse a été un supplice sans ta compagnie, mais le contact gardé m'a encouragé à aller jusqu'au bout, j'ai hâte qu'on se retrouve ! à Malek pour son amitié et ses motivants « je suis fière de toi », à Salima pour ses histoires et surtout la façon unique de les raconter, à Asma, Meriam et Soumaya, j'espère que vous me pardonneriez d'avoir raté vos mariages, à Khaoula pour sa bonne humeur, Ahmed pour sa joie sincère pour chacun de mes pas positifs, Salma pour sa bonne humeur (et ses pannes de voiture). De manière générale merci à tous d'avoir été là, même si par moments j'avais un peu déserté la planète...

La thèse a parfois été un moment difficile pour mes proches. Elle est très preneuse en temps et j'avoue ne pas les avoir consacré le temps qu'ils méritent, je voudrais donc remercier toutes mes tantes, mes oncles, mes cousines, mes cousins et la nouvelle génération qui pousse rapidement, pour leur soutien, les gâteaux envoyés et toutes les petites attentions, une pensée particulière à Sana et mes trois rayons de soleil Ons, Noor et Zeineb. Je sais que mon absence a été longue et j'espère rattraper le retard accumulé.

Un remerciement spécial à mon petit frère Nabil, qui malgré la distance (encore sur un autre continent, l'Asie) a su garder un contact quotidien, je suis fière de ta réussite fréro, ton

humour a su égayer les moments les plus tendus et difficiles, j'espère qu'on se réunira très bientôt. Merci à ma grande sœur Nadia, sans laquelle cette thèse n'aurait vraiment pas été possible (mon portefeuille volé la veille de mon départ à l'entretien de Montpellier, merci pour l'énorme coup de pouce en me rachetant des billets et en m'encourageant à ne pas baisser les bras), merci pour ton soutien infailible, ton aide a été inestimable à chacun de mes stages, à chaque installation, par chaque coup de fil, chaque colis surprise... Je te remercie du fond du cœur, tu es la sœur dont chacun rêve, mais y en a qu'une et c'est pour moi! Merci à mon beau-frère Achraf, pour sa bienveillance et ses conseils pour la suite de ma carrière et au petit bout de chou en route qui va me faire le grand bonheur de devenir tata :) Merci aussi à Dalila, pour son amour et ses larmes à chaque départ...et à chaque retour.

Je souhaite enfin remercier les personnes les plus chères à mon cœur, qui m'ont le plus aidé et soutenu dans cette aventure, comme ils ont pu le faire tout au long de ma vie : papa et maman, Mohamed et Rachida. Sans eux, je n'aurais jamais eu l'opportunité de continuer mes études en France et effectuer cette thèse. Leur présence, encouragement, soutien quotidien indéfectible et enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci d'avoir toujours cru en moi. Je vous aime....Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. J'espère que vous trouverez dans ce travail et à travers son aboutissement toute l'expression de ma gratitude.

Pour finir, j'adresse une pensée émue à la mémoire de mes grands-parents, j'espère que de là où ils sont, ils sont fiers de moi.

Merci infiniment...

Résumé

La présence de matière biologique (biofilms) dans les sites de stockage géologique profond, d'éléments toxiques ou encore de l'eau potable des aquifères est maintenant clairement démontrée. Cette biomasse est à l'origine de processus physiques et chimiques qui modifient considérablement la durabilité et la pérennité des sites concernés. Ces processus, principalement de type oxydo-réductif, sont encore mal compris. Ceci est principalement dû aux méthodes d'investigation, principalement macroscopiques, loin de l'échelle micrométrique caractéristique des bactéries. Seules des études, basées sur des méthodes d'investigation locale, peuvent apporter les informations requises. Ainsi, nous avons développé un dispositif expérimental basé sur l'utilisation combinée de la microscopie optique (en transmission), la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie AFM en mode électrique et électrochimique (EC_AFM) afin d'obtenir des informations simultanées sur la topographie de l'échantillon et sur les processus électrochimiques à l'échelle des bactéries.

La première étape sensible consistait à utiliser l'AFM sur des échantillons biologiques en milieu liquide: nous présentons ici les résultats de l'imagerie AFM en milieu liquide de plusieurs types de bactéries dans leurs conditions physiologiques naturelles (conditions *in vivo*). Aucun protocole d'immobilisation, ni chimique ni mécanique, n'a été nécessaire; et pour la première fois, les mouvements de reptation de cyanobactéries *Nostoc* ont été étudiés par l'AFM. Les études AFM ont permis d'acquérir des données topographiques mais aussi mécaniques : nous avons pu ainsi mesurer le module d'Young, la pression de turgescence de différentes souches bactériennes (*Anabaenopsis circularis*, *Rhodococcus wratislaviensis*). Cette étude complète, a révélé que l'imagerie AFM est donc possible sur des espèces vivantes en mouvement. Ces résultats ouvrent une grande fenêtre sur de nouvelles études d'intérêts tels que la formation de biofilms et les propriétés dynamiques de bactéries dans des conditions physiologiques réelles. La deuxième étape délicate était de combiner l'AFM aux mesures optiques et électriques. Nous avons développé un nouveau dispositif expérimental permettant (i) le suivi de l'évolution de la croissance bactérienne par la mesure des propriétés optiques comme la densité optique DO (pour le développement bactérien en volume – milieu planctonique) , ou l'analyse de l'image du substrat par comptage du nombre de bactéries sur la surface de l'échantillon (biofilm), et (ii) les mesures électriques et électrochimiques. L'ensemble de ces résultats sera prochainement appliqué au développement de nouveaux outils de surveillance d'une biodépollution de terrain contaminé par les hydrocarbures, par le suivi *in situ* et en temps réel de l'activité de bactéries dépolluantes (ECOTECH_BIOPHY ANR).

Mots clés : AFM; Microscope à force atomique, bactérie, biofilm, liquide, imagerie, pression de turgescence, module d'Young, cyanobactéries, reptation, mobilité, matrice extracellulaire, EPS; Exopolysaccharides ; *Anabaenopsis circularis*; *Rhodococcus wratislaviensis*, *Noctoc*; électrochimie, SECM, Microscopie électrochimique, Microscopie AFM en mode électrique, EFM, biodépollution, monitoring.

Abstract

The presence of biological matter (biofilms) in deep geological sites for storage of, for instance, toxic elements or groundwater in aquifers was clearly proved. That biomass triggers physical and chemical processes which greatly modify the durability and the sustainability of the sites. These processes, mainly from oxidative/reductive reactions, are poorly understood. This is mainly due to the fact that former studies were done at the macroscopic level far away from the micrometric scale where relevant processes induced by bacteria take place. Investigations at microscopic level are needed. Thus, we developed an experimental set-up based on the combined use of optical microscopy (transmission), atomic force microscopy (AFM) and electrical and electro-chemical AFM microscopy (EC_AFM) in order to get simultaneous information on topographic and electro-chemical processes.

The first highly sensitive step was to use AFM with biological samples in liquid environment: we present here a study about AFM imaging of living, moving or self-immobilized bacteria, in their genuine physiological liquid medium and in true in vivo conditions. No external immobilization protocol, neither chemical nor mechanical was needed. For the first time, the native gliding movements of Gram negative *Nostoc* cyanobacteria upon the surface were studied by AFM. AFM height and mechanical stiffness data were simultaneously acquired. From these, mechanical parameters, inner turgor pressure and Young modulus, were derived for different bacterial species (*Anabaenopsis circularis*, *Rhodococcus wratislaviensis*). Our study revealed that AFM imaging is thus possible on moving living species. These results open a large window on new studies of both dynamical phenomena of practical and fundamental interests such as the formation of biofilms and dynamic properties of bacteria in real physiological conditions.

The second delicate step was to combine AFM and optical measurements with electrical ones.

We mounted a new experimental set-up coupling real-time (i) monitoring of optical properties as the optical density (OD) evolution related to bulk bacterial growth in liquid or as the counting of number of bacteria adhering on the surface of the sample as well and (ii) electrical and electrochemical measurements.

Furthermore, these results will shortly be applied to the optimized monitoring of the in-situ activity of bacteria consuming oil pollutants, following this way, in real-time, the bioremediation of an oil-contaminated soil (ANR ECOTECH_BIOPHY program).

Key words :AFM; atomic force microscopy; bacteria; biofilm; liquid; imaging, immobilization, cyanobacteria; gliding movement; extra cellular matrix; EPS, turgor pressure, Young modulus, Exopolymeric Saccharide, slime; *Anabaenopsis circularis*; *Rhodococcus wratislaviensis*, *Noctoc*; electrochemistry, SECM; scanning electrochemical microscopy; EFM; Electrical Force Microscopy, bioremediation, monitoring.