



Titre: Effets antibactériens des nanoparticules de cuivre, oxyde de cuivre
et oxyde de fer

Auteur: Myriam Talantikit
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Talantikit, M. (2014). Effets antibactériens des nanoparticules de cuivre, oxyde de
cuivre et oxyde de fer [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1608/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1608/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** L'Hocine Yahia, & Jean Barbeau
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

EFFETS ANTIBACTÉRIENS DES NANOPARTICULES DE CUIVRE, OXYDE DE CUIVRE
ET OXYDE DE FER

MYRIAM TALANTIKIT
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

EFFETS ANTIBACTÉRIENS DES NANOPARTICULES DE CUIVRE, OXYDE DE CUIVRE
ET OXYDE DE FER

présenté par : TALANTIKIT Myriam

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme HOEMANN Caroline, Ph. D., présidente

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. BARBEAU Jean, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. MATEESCU Mircea Alexandru, Ph. D., membre

DÉDICACE

À mes parents,

Pour tout l'amour qu'il me porte, leur confiance, leurs sacrifices et leur soutien inconditionnel

À mon frère Rédha,

Pour sa présence malgré la distance qui nous sépare, et ses conseils

À Hicham,

Pour son écoute, son support et ses paroles rassurantes au quotidien

À toute ma famille et mes amis,

Pour leur présence et leur soutien

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, Pr L'Hocine Yahia, pour son attention, sa disponibilité malgré ses nombreuses charges. Je le remercie pour son accueil au sein du LIAB et surtout pour son encadrement durant quelques années. Ce fut un réel plaisir de l'avoir pour directeur de recherche, chaque discussion avec lui est un remontant idéal contre les baisses de motivation et une réponse toujours "positive" à mes questions et mes inquiétudes. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon codirecteur, Dr Jean Barbeau pour ses nombreux et précieux conseils scientifiques, pour ses suggestions et ses remarques judicieuses tout au long de ce travail de maîtrise. Merci aussi pour le temps consacré aux nombreuses lectures de ce manuscrit qui m'ont permis d'aborder la soutenance du mémoire avec sérénité.

Mes remerciements s'adressent aussi à Annie Leduc pour son aide importante, son écoute, son soutien et sa gentillesse tout au long de cette maîtrise.

D'autres personnes du laboratoire m'ont apporté des coups de pouce précieux dans mon travail (Taraneh Javanbakht, Karina Mireles). Enfin le laboratoire était un lieu chaleureux grâce à la bonne humeur de tous. Encore un merci, à tous les étudiants avec lesquels j'ai collaboré au sein du Laboratoire

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je vous remercie tous de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.

Madame Caroline Hoemann, PhD, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être président de mon jury. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail.

Monsieur Mircea Alexandru Mateescu, PhD, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury.

RÉSUMÉ

L'augmentation de la longévité de la population occidentale induit une augmentation de l'utilisation des implants médicaux. Ces implants peuvent être contaminés par des bactéries résistantes causant l'apparition d'infections nosocomiales (IN) qui sont aujourd'hui un problème clinique majeur. Le traitement commun contre les bactéries est l'utilisation d'antibiotiques due à leur rapidité et efficacité. Cependant, un trop long contact des bactéries aux antibiotiques a causé la résistance de ces dernières. Ajoutant à ce problème, les bactéries ont la capacité de former un biofilm (couche protectrice) lorsqu'elles se trouvent dans un certain environnement. Les bactéries en biofilm sont très difficiles à détruire et la sécrétion d'une matrice de polysaccharides rend presque impossible l'accès des antibiotiques. Les nanoparticules sont connues pour leur toxicité antibactérienne, mais déterminer la meilleure nanoparticule pour des applications biomédicales et qui ait un effet antibactérien élevé est compliqué.

L'objectif général à long terme vise à développer des "nano-biotiques" afin de prévenir les infections nosocomiales liées à l'implantation chirurgicale. Dans ce projet, nous avons évalué *in vitro* l'effet antibactérien des nanoparticules (cuivre, oxyde de cuivre, nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer et nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote (NO) sur des bactéries.

Des caractérisations physico-chimiques des différentes nanoparticules et microparticules ont été effectuées pour déterminer leur taille et leur composition, et leur chimie de surface à l'aide de méthodes comme TEM, FTIR et XRD. Différents paramètres jouent un rôle important dans la toxicité des particules. Dans un premier temps, nous avons adapté les tests microbiologiques pour pouvoir étudier la biotoxicité des nanoparticules. Par la suite, la toxicité des nanoparticules de cuivre pur et d'oxyde de cuivre sur les bactéries (*S.aureus* et *E.coli*) a été étudiée pour déterminer l'importance de la composition des nanoparticules sur la toxicité. La taille est aussi un paramètre important, c'est pour cela que nous avons étudié l'effet antibactérien de microparticules et de nanoparticules de cuivre. La toxicité bactérienne des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, qui serviront de vecteurs magnétiques pour délivrer le NO (molécule antibactérienne) de façon contrôlée, a aussi été étudiée. En effet, une fois le NO libéré, ces nanoparticules magnétiques vont continuer à agir sur les bactéries. Finalement, les

nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre ont été mises en contact avec un biofilm de *S.aureus* pour voir les différences avec des bactéries planctoniques.

Nos résultats de caractérisation des nanoparticules de cuivre montrent que ces dernières ne sont pas pures et qu'une couche d'oxyde se forme à leur surface, ce qui induirait une réduction de leur toxicité. Nos résultats, sur l'importance de la taille des particules, viennent confirmer la littérature, que les nanoparticules sont plus toxiques que les microparticules. Nos tests sur nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, sans NO, ne démontrent pas un effet antibactérien important. Des tests préliminaires microbiologiques ont été faits sur les nanoparticules couplées au NO qui nous montre qu'elles auraient un effet antibactérien. Toutefois, les résultats avec le NO ne sont pas concluants en raison de difficultés techniques pour l'attachement du NO aux nanoparticules.

Ces travaux ont permis de montrer que les nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre sont des antibactériens très importants, mais les doses utilisées pourraient être trop toxiques pour des applications biomédicales. Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (sans NO) n'ont pas un effet antibactérien très important, mais sont biocompatibles. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont d'excellents candidats comme vecteurs de délivrance et de ciblage du NO antibactérien. Ces travaux ont constitué le début du développement de nouveaux agents antimicrobiens basés sur les nanoparticules métalliques.

Mots clés : nanoparticules, cuivre, oxyde de cuivre, biofilm, antibactérien, oxyde de fer, monoxyde d'azote

ABSTRACT

Population longevity tends to increase in occidental countries inducing an increment in medical implants use. Resistant bacteria may contaminate those implants causing nosocomial infections. Common treatment for bacteria is antibiotic, used mainly for their speed and efficacy. An overuse of antibiotics induced bacteria to be resistant to them. Adding to this issue, when bacteria are in a certain environment, bacteria tend to communicate between themselves and create a biofilm (protective layer). Polysaccharides forming the biofilm don't allow antibiotics to penetrate inside the biofilm. Bacteria in a biofilm are extremely hard to kill. An alternative to resolve all those issues is to use nanoparticles as antimicrobial agents. They are known to have antibacterial effect. But the

The main objective is to study the effects develop "nano-biotics" that can prevent nosocomial infections due to surgical implants. In this project, we evaluated *in vitro* antibacterial effects of some nanoparticles (copper, copper oxide, superparamagnetic iron oxide, and superparamagnetic iron oxide coupled with nitric oxide (NO) on bacteria.

Nanoparticles and microparticles characterizations have been done to determine their size, their composition and their surface chemistry using TEM and FTIR. Different parameters play a crucial role in antibacterial toxicity of particles. First, we adapted microbiological tests to elucidate nanoparticles biotoxicity. Then, pure copper and copper oxide nanoparticles have been studied to determine the importance of nanoparticles composition in toxicity. Size is another important parameter, explaining our interest to study both copper micro and nanoparticles on bacteria (*S.aureus* and *E.coli*). Bacterial toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, used as a magnetic vehicle to deliver NO (antibacterial molecule), has been studied. Once NO is delivered, iron oxide nanoparticles still react with bacteria. Finally, copper and copper oxide nanoparticles were in contact with *S.aureus* biofilm to see their effect and the difference with planktonic bacteria.

Our nanoparticles characterizations of copper shows that these nanoparticles are not completely pure but a thin oxide layer at their surface forms, which can lower their toxicity. Our results on the importance of particles size, confirm what was seen in the literature. Nanoparticles seems to be more toxic than microparticles. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles results, alone, don't show a big antibacterial effect. Preliminary tests were done on NO coupled

nanoparticles, and it seems there is an antibacterial effect. However, NO results are not conclusive because of some technical difficulties during NO attachment on nanoparticles. .

These studies allowed us to show that copper and copper oxide nanoparticles were a good antibacterial but the dose used might be too important for biomedical applications. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles have a low antibacterial effect but are biocompatible. They are an excellent candidate as vehicle for NO delivery to a specific site. These studies are the first effort made to the development of new antimicrobial agents based on metallic nanoparticles.

Key words: nanoparticles, copper, oxide copper, biofilm, antibacterial, iron oxide, nitric oxide

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ANNEXES	XVI
INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte du projet	1
1.2 Problème clinique.....	1
1.2.1 Infections nosocomiales	1
1.2.2 Les infections nosocomiales liées aux implants médicaux	3
1.2.3 Résistance des bactéries	4
1.3 État des connaissances	9
1.3.1 Les nanoparticules.....	9
1.3.2 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre	10
1.3.3 Nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer.....	13
1.3.4 Le monoxyde d'azote	16
CHAPITRE 2 OBJECTIFS	20
2.1 Hypothèses de recherche	20
2.2 Objectifs	21
2.2.1 Objectif général	21
2.2.2 Objectifs spécifiques	21

CHAPITRE 3	MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
3.1	Synthèse des nanoparticules	22
3.1.1	Oxyde de fer (SPIONs)	22
3.1.2	Cuivre et oxyde de cuivre.....	22
3.1.3	Fonctionnalisation des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer	24
3.2	Caractérisations des nanoparticules	25
3.2.1	TEM	25
3.2.2	FTIR	26
3.2.3	XRD	27
3.2.4	Apollo.....	28
3.3	Tests microbiologiques	28
3.3.1	Choix des bactéries.....	28
3.3.2	Préparation des bactéries	29
3.3.3	Tests antimicrobiens.....	29
3.3.4	Compte viable	31
3.3.5	Formation de biofilm.....	32
CHAPITRE 4	RÉSULTATS	35
4.1	Caractérisation des nanoparticules	35
4.1.1	Microparticules de cuivre.....	35
4.1.2	Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre	36
4.1.3	Nanoparticules d'oxyde de fer	40
4.1.4	Nanoparticules d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote : tests préliminaires....	41
4.2	Tests microbiologiques	42
4.2.1	Microparticules de cuivre.....	42

4.2.2 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre	44
4.2.3 Nanoparticules d'oxyde de fer	46
4.2.4 Nanoparticules d'oxyde de fer : tests préliminaires	48
5. DISCUSSION	51
5.1 Discussion des résultats.....	51
5.1.1 Particules de cuivre et d'oxyde de cuivre.....	51
5.1.2 Nanoparticules d'oxyde de fer	57
5.1.3 Nanoparticules d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote	58
5.2 Limite de l'étude	59
5.2.1 Fonctionnalisation du monoxyde d'azote	59
5.2.2 Mesure du monoxyde d'azote	61
5.2.3 Tests microbiologiques	63
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	64
6.1 Conclusion.....	64
6.2 Recommandations pour travaux futurs	65
6.2.1 Caractérisations physico-chimiques	65
6.2.2 Fonctionnalisation et mesure du NO	65
6.2.3 Tests microbiologiques	66
BIBLIOGRAPHIE	69
ANNEXES.....	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Schéma montrant a) les différents types de contamination par des bactéries et b) photographie d'un biofilm bactérien c) la formation des biofilms (E. Taylor & T. J. Webster, 2011).....	4
Figure 1.2: Schéma représentant les membranes des bactéries à a) Gram positif et b) Gram négatif (Mohammad J. Hajipour, Katharina M. Fromm, Ali Akbar Ashkarran, Dorleta Jimenez de Aberasturi, & Vahid Serpooshan ⁶ , 2012)	6
Figure 3.1: Schéma représentatif du mécanisme du procédé de plasma par induction (Jiayin et al., 2010).....	23
Figure 3.2: Photo du TEM (Centre de Caractérisation Microscopique des Matériaux, École Polytechnique).....	26
Figure 3.3: Photo du FTIR à l'École Polytechnique	27
Figure 3.4: Photo de Apollo 1000 (École Polytechnique)	28
Figure 3.5: Photo représentant la formation de biofilm de <i>S.aureus</i>	33
Figure 3.6: Schéma représentant l'effet de différentes concentrations des NPs de Cu et CuO (150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875mg/mL) sur un biofilm de <i>S.aureus</i> . C- contrôle négatif biofilm <i>S.aureus</i> en milieu bactérien (TSB).....	34
Figure 4.1: Morphologie des microparticules de Cu par SEM (x500).....	35
Figure 4.2: Histogrammes indiquant les distributions de la taille des microparticules de Cu	35
Figure 4.3: Images TEM de a) nanoparticules de Cu et b) nanoparticules CuO.....	36
Figure 4.4: Histogrammes indiquant les distributions de la taille de a) cœur des nanoparticules de Cu b) de la coquille des nanoparticules de Cu et c) les nanoparticules de CuO	37
Figure 4.5: Spectres FTIR des NPs de a) cuivre et b) oxyde de cuivre immergées dans le milieu de culture bactérien	38
Figure 4.6: Données XRD des nanoparticules de Cu et CuO	39
Figure 4.7: Images TEM et histogrammes indiquant les distributions des SPIONs	40

Figure 4.8: spectre FTIR SPIONs+NO	41
Figure 4.9: Courbe de libération de NO	42
Figure 4.10 : Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration en MPs de Cu (3mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche <i>S.aureus</i>	43
Figure 4.11: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration en MPs de Cu (6mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche <i>E.coli</i>	44
Figure 4.12: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration des NPs Cu et CuO (0.325mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche <i>S.aureus</i>	45
Figure 4.13: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration de NPs Cu et CuO (0.325mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche <i>E.coli</i>	46
Figure 4.14: : Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h (T1), 3 h (T3) et 24 h (T24) d'incubation pour la souche <i>S.aureus</i>	47
Figure 4.15: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h (T1), 3 h (T3) et 24 h (T24) d'incubation pour la souche <i>E.coli</i>	48
Figure 4.16: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h d'incubation pour la souche a) <i>S.aureus</i> et b) <i>E.coli</i> .49	
Figure 4.17: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 3 h d'incubation pour la souche a) <i>S.aureus</i> et b) <i>E.coli</i> .49	
Figure 4.18: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 3 h d'incubation pour la souche a) <i>S.aureus</i> et b) <i>E.coli</i> .50	

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Cu	Cuivre
CuO	Oxyde de cuivre
DCFDA	Dichlorodihydrofluoresceine
DMSA	Acide dimercaptosuccinique
DRH	Dihydrorhodamine
ERN	Espèces réactives de nitrogène
ERO	Espèces réactives d'oxygène
Fe ₃ O ₄	Oxyde de fer
FTIR	« Fourier Transformed InfraRed » : Transformée de Fourier infrarouge
GSH	Glutathionne
Hmf	Flavohémoglobine
IN	Infections nosocomiales
K ₂ HPO ₄	Potassium phosphate dibasique
KH ₂ PO ₄	Phosphate potassium monobasique
MDR	Drogues multi résistantes : Multi Drug Resistant
MPs	Microparticules
MSA	Acide méthylsulfonique
NaCl	Chlorure de sodium
NO	Monoxyde d'azote
NPs	Nanoparticules
OD	Densité optique
PP	Protéose Peptone

PBS	Phosphate Buffered Saline
SOD	Superoxyde dismutase
SPIONs	Supermagnetic Iron Oxide Nanoparticles
TB	Tuberculosis
TEM	Transmission Electron Microscopy
TSA	Trypo-caséine soja gélose
TSB	Tryptic Soy Broth
XDR	Extensively Drug Resistant
XRD	X-ray crystallography

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1: Tableau comparatif des différents NPs de Cu et CuO	80
ANNEXE 2: FTIR des SPIONs fonctionnalisées au NO	81
ANNEXE 3: Matériels expérimentaux	82

INTRODUCTION

1.1 Contexte du projet

Le problème des infections nosocomiales (IN) est un enjeu très important dans le domaine médical. Pour répondre à cette problématique, au cours des dernières années, le LIAB (Laboratoire d'Innovations de Bioperformance et d'Analyses) a développé de nouvelles techniques de stérilisation à base de plasma et d'ozone en collaboration avec des physiciens (Wertheimer, Moisan) et des microbiologistes (Barbeau, Belhumeur, Marchand) (Moisan et al., 2001; Moreau et al., 2000).

Plus récemment avec l'émergence de la nanomédecine, le LIAB s'intéresse aux nanotechnologies pour des applications médicales. Notamment le développement de nanoparticules (NPs) inorganiques (métalliques, oxydes métalliques) comme véhicule pour délivrer des molécules et la conception des nanorobots (Martel et al., 2004). C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent projet de maîtrise qui vise à exploiter la toxicité antibactérienne des nanomatériaux pour développer des « nano-biotiques » comme alternative aux antibiotiques classiques. En parallèle, deux étudiantes au doctorat travaillent sur la caractérisation des différentes nanoparticules et la fonctionnalisation des NPs de fer pour délivrer le monoxyde d'azote (NO) (Zhang et al., 2012). Elles déterminent aussi la cytotoxicité de ces dernières (Mbeh et al., 2012).

1.2 Problème clinique

1.2.1 Infections nosocomiales

Une infection nosocomiale est une infection contractée à l'hôpital, absente lors de l'admission du patient et qui se développe après l'admission (Breathnach, 2013). Les infections nosocomiales sont fréquentes, mais elles peuvent être sérieuses, voire fatales. Les infections nosocomiales sont un problème majeur dans le monde et leur prévalence tend à augmenter. Au

Québec, 80,000 à 90,000 personnes (soit 10% des admissions), 1% des admissions dans les pays d'Europe, et jusqu'à 40% en Asie, Amérique Latine et l'Afrique subsaharienne (Lynch, 1997) sont susceptibles de contracter une infection nosocomiale (Tietjen, 2003). Aux États-Unis, en 2010, les IN ont causé la mort de 99,000 personnes (Breathnach, 2013; Hetrick, Shin, Paul, & Schoenfisch, 2009). Les complications acquises à hôpital vont toucher 1.4 millions de patients dans le monde (Tikhomirov, 1987). Pour traiter plus de deux millions d'infections nosocomiales par an aux États-Unis, il faut investir approximativement 11 milliards de dollars (Schierholz & Beuth, 2001). Les infections peuvent survenir après la chirurgie (l'hygiène du personnel hospitalier) ou après les procédures médicales invasives (incisions chirurgicales qui donnent un accès aux pathogènes dans le corps, les dispositifs intravasculaires, les cathéters (urinaires), les prothèses articulaires ou les valves cardiaques qui agissent comme une niche pour la croissance bactérienne (Figure 1.1) (Arciola et al, 2012 ; Breathnach, 2013 ; Livermore, 2003). Les infections associées aux implants contribuent à l'échec, à l'augmentation de la morbidité et sans parler des coûts. Certaines infections seraient inévitables, par exemple l'infection est presque systématique pour un malade gravement immunodéprimé qui présente une infection nosocomiale en cours d'hospitalisation. D'où le travail essentiel de l'équipe hospitalière à appliquer des procédures rigoureuses de contrôle des infections pour ne pas transmettre d'infection à cette catégorie de patients. D'autres facteurs contribuent à l'apparition des infections nosocomiales comme les facteurs reliés à l'état de santé du patient ou les instruments contaminés lors d'interventions médico-chirurgicales.

L'origine de ces infections est le plus souvent la colonisation par les bactéries opportunistes. Les microorganismes causant les IN sont communément retrouvés sur le corps du patient lui-même (la flore intestinale). Mais ils peuvent aussi venir de l'équipe médicale après contact avec le patient, contamination des instruments médicaux et seringues, et l'environnement (flore extérieure) (R. J. Gordon & Lowy, 2008). De plus, les problèmes de résistance aux antibiotiques ont permis le développement de bactéries tenaces et difficiles à éradiquer. Les microorganismes responsables des IN se retrouvent autant chez les Gram positifs (*Staphylococcus* sp, *Entérocoques*) que les Gram négatifs (*Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*) et les levures (*Candida* sp) (Ronald N. Jones & Pfaller, 1998) ; (Livermore, 2003).

1.2.2 Les infections nosocomiales liées aux implants médicaux

La longévité de la population dans les pays occidentaux tend à croître de plus en plus. Cette augmentation de la durée de vie joue un rôle sur l'usure et les troubles des différentes articulations du corps (arthrite, arthrose, ostéoporose). L'utilisation d'implants médicaux a donc augmenté proportionnellement à l'augmentation de la longévité de la vie (Barbeau J., Carl Gauthier, & Payment, 1998; Darouiche, 2001; Harris & Richards, 2006; Nablo, Prichard, Butler, Klitzman, & Schoenfisch, 2005; Schierholz & Beuth, 2001). Malgré les préventions utilisées pour contrer ces infections dues aux implants médicaux, les infections persistent. Les implants médicaux seraient la cause de 45% de toutes les infections nosocomiales (Nablo, Rothrock, & Schoenfisch, 2005).

L'augmentation de l'utilisation des implants médicaux est proportionnellement reliée à l'augmentation des infections nosocomiales. En effet, des études ont été effectuées afin de démontrer que les implants médicaux sont utilisés beaucoup plus souvent. Les pourcentages des IN pour des implants posés pour la première fois sont très élevés (des dispositifs d'assistance du cœur ont 1 chance sur 4 à une chance sur deux de contracter des IN) avec des mortalités élevées (Darouiche, 2001; Harris & Richards, 2006). D'autres implants sont la cause des IN, mais dont la mortalité est très faible (les valves cardiaques ou les prothèses articulaires ont 1 chance sur 33 à une chance sur 100 de contracter des IN) (Darouiche, 2001; Harris & Richards, 2006). La probabilité de contracter des IN augmente quand les dispositifs sont réimplantés dans le corps (Darouiche, 2001).

La pathogénèse des IN reliées aux dispositifs médicaux est due à des interactions entre les facteurs du dispositif, de l'hôte et de la bactérie. Initialement, les bactéries sont adhérentes passivement à la surface des implants et il faut des interactions avec les implants pour générer les IN. Plusieurs espèces bactériennes possèdent des protéines, les adhésines, qui permettent l'attachement à la surface des implants (Campoccia, Montanaro, & Arciola, 2006; Darouiche, 2001; Harris & Richards, 2006). *S.aureus*, afin de s'attacher à l'implant, a besoin des ligands de l'hôte (fibronectine, fibrogène, collagène) (Campoccia et al., 2006; Darouiche, 2001; Harris & Richards, 2006).

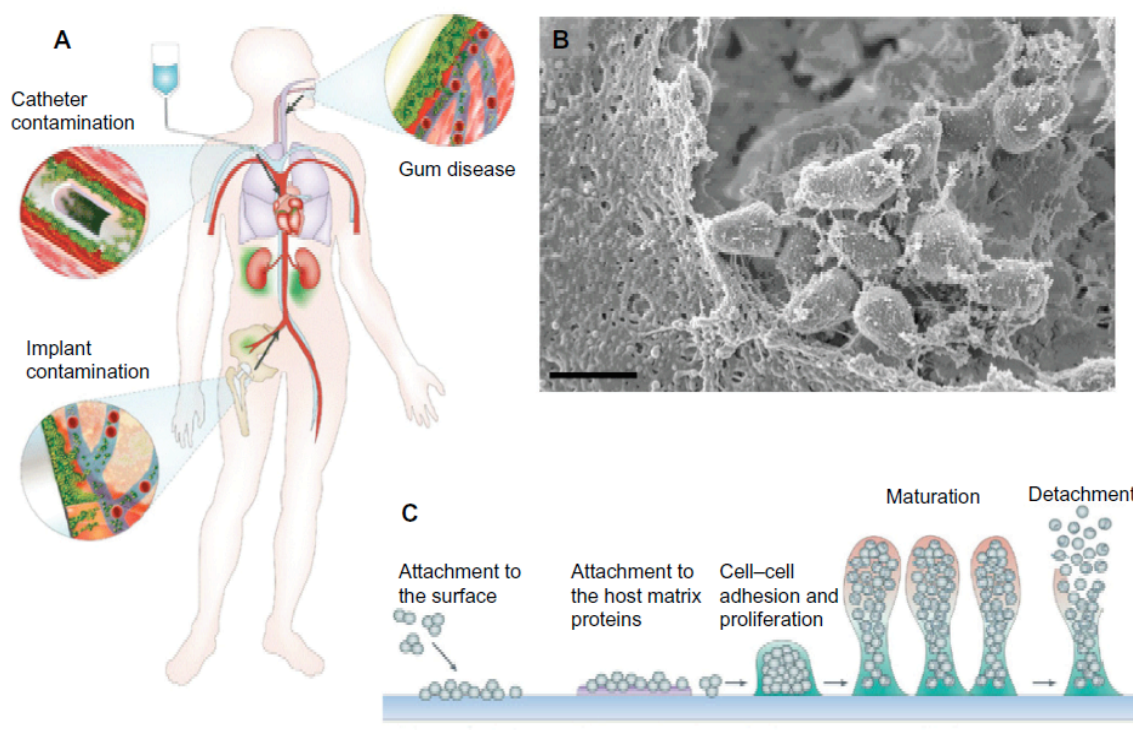


Figure 1.1: Schéma montrant a) les différents types de contamination par des bactéries et b) photographie d'un biofilm bactérien c) la formation des biofilms (E. Taylor & T. J. Webster, 2011)

1.2.3 Résistance des bactéries

1.2.3.1 Résistance aux antibiotiques

Le problème des résistances aux antimicrobiens n'est pas nouveau. La résistance antibiotique est le défi le plus difficile à résoudre dans le domaine médical pour le traitement des maladies infectieuses. Lors des premières utilisations d'antibiotiques, les problèmes de résistance étaient marginaux. Cependant, la surutilisation des antibiotiques a permis de sélectionner des organismes résistants qui colonisent et induisent les infections difficiles à traiter. Lorsque les bactéries deviennent résistantes à plusieurs types d'antibiotiques, appelées multirésistantes (MDR), le traitement de ce genre d'infections est extrêmement difficile (Breathnach, 2013; Campoccia et al., 2006). Cette résistance aggrave sévèrement le problème des IN et met de la pression pour le développement de nouveaux traitements (Ziebuhr, 2006 ; Pavon-Djavid, 2005;

Raffi 2010). Il est possible de distinguer plusieurs types de résistance microbienne : génétique, microbiologique ou clinique. Les microorganismes peuvent détenir des gènes de résistance, ces gènes permettent aux bactéries de posséder une résistance génétique. La résistance microbiologique est la croissance d'une souche bactérienne en présence d'antibiotiques. Et la résistance clinique se traduit par l'absence d'amélioration du patient après 72h d'administration d'un antibiotique (Low et al., 2002; Weiss, 2002).

Trois groupes de pathogènes résistants aux antibiotiques émergent comme un problème de santé important (Breathnach, 2013). Le premier groupe contient la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) qui cause 19,000 morts par année aux USA (Klevens et al., 2007). De plus, elle occasionne des coûts d'environ 3 à 4 millions de dollars additionnels par année. La forte prévalence de SARM augmente l'émergence de la souche *S.aureus* résistante à la vancomycine (SARV). Elle est plus difficile à traiter que SARM tout en étant aussi meurtrière ; à devenir le prochain défi à surmonter dans les hôpitaux (Breathnach, 2013; Fischbach & Walsh, 2009). *S.aureus* une bactérie à Gram positif. Leur membrane cellulaire est composée essentiellement de peptidoglycanes (partie glucidique (polysaccharides) et partie peptidique), l'espace périplasmique et la membrane plasmique (Figure 1.2). Dans la couche de peptidoglycanes, il est possible de retrouver des acides lipotéichoïques (LTA). Ces acides permettent de rendre de donner une charge négative à la couche. Les peptidoglycanes sont assez poreux et peuvent être pénétrés par des NPs d'environ 2nm.

Le deuxième groupe de pathogènes comprend les bactéries à Gram négatif multi-résistantes (MDR). Ces dernières sont moins répandues que les SARM, mais sont une menace pour l'apparition des maladies incurables (Breathnach, 2013). Ces différentes souches sont résistantes à certaines ou toutes les classes d'antibiotiques communément utilisés pour le traitement des bactéries à Gram négatif. La recherche pour trouver de nouveaux antibiotiques efficaces est rendue difficile, car les bactéries à Gram négatif peuvent bloquer toute entrée d'antibiotiques. Si certains antibiotiques arrivent à passer cette barrière ; ils sont expulsés par les pompes à efflux (Fischbach & Walsh, 2009). Les bactéries à Gram négatif quant à elles, elles ont une membrane différente des bactéries à Gram positif. Leur membrane est composée d'une membrane externe, d'une fine couche de peptidoglycanes, l'espace périplasmique et d'une membrane plasmique (Figure 1.2). Dans leur membrane externe, il est possible de remarquer des lipopolysaccharides (LPS). Comme les LTA, les LPS permettent de donner à la membrane

externe une charge négative. La membrane externe est aussi composée de plusieurs protéines dont les porines qui laissent passer les nutriments hydrophiliques. D'autres protéines sont présentes dont les lipoprotéines, OmpA mais qui n'ont pas de fonction de transport des molécules.

Le troisième groupe de pathogènes résistants contient d'autres MDR et aussi la souche *Mycobacterium tuberculosis* ultra résistante (XRD-TB ou MDR-TB), qui est l'une des plus grandes menaces dans les pays en voie de développement. Le traitement pour MDR-TB nécessite deux années d'antibiotiques, accompagné d'effets secondaires très sérieux. XRD-TB est encore plus difficile à traiter et est souvent fatale (Fischbach & Walsh, 2009).

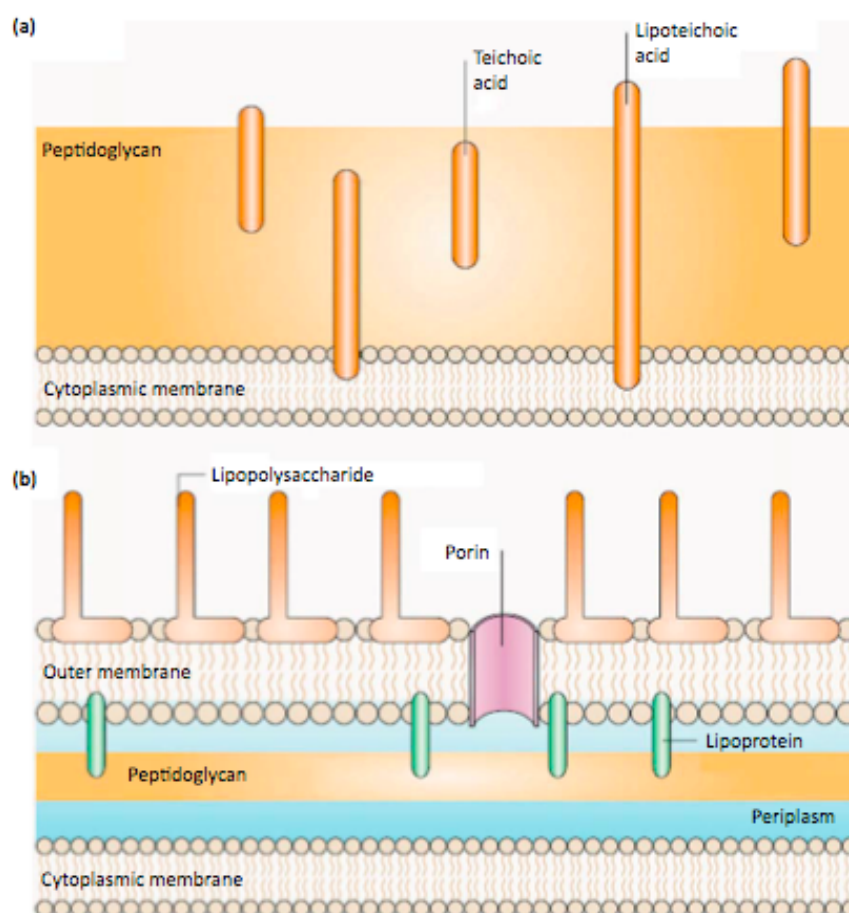


Figure 1.2: Schéma représentant les membranes des bactéries à a) Gram positif et b) Gram négatif (Hajipour et al., 2012)

1.2.3.2 Biofilm sur les dispositifs médicaux

Les bactéries adhérant sur les implants médicaux sont dans la plupart du temps des bactéries commensales (ayant donc un potentiel pathogène très faible) (Darouiche, 2001; Stewart, 2003). Cependant, elles sont opportunistes (Campoccia et al., 2006) et ainsi peuvent causer les infections nosocomiales. Lorsque les bactéries se retrouvent sur un dispositif médical, elles peuvent produire une matrice extracellulaire (sucre composé de polysaccharides, protéines et l'ADN libre) (Harris & Richards, 2006). Cette matrice protège les bactéries contre le système immunitaire (Nablo, Prichard, et al., 2005; Stewart, 2003) et les agents antimicrobiens (Simões, Simões, Machado, Pereira, & Vieira, 2006); (Simoes & Vieira, 2009)). Les communautés bactériennes ainsi protégées par une matrice extracellulaire constituent le biofilm (Figure 1.1).

Les bactéries peuvent adhérer à la surface des implants médicaux et causer des infections en formant ce biofilm (Campoccia et al., 2006; Hetrick et al., 2009; Peulen & Wilkinson, 2011). Les bactéries formant le biofilm sont donc très difficiles à éliminer, et peuvent se détacher du biofilm ce qui augmente le risque d'IN. Les biofilms sont plus résistants aux antimicrobiens que les cellules planctoniques (les bactéries libres) (Campoccia et al., 2006). La matrice du biofilm diminue la capacité des agents antimicrobiens à atteindre les microorganismes dans le biofilm en limitant la diffusion ou en entrant en interactions chimiques avec les agents antimicrobiens et en diminuant leur efficacité (Mah & O'Toole, 2001).

Une des stratégies pour prévenir la formation de biofilm est de nettoyer et désinfecter régulièrement les surfaces avant l'attachement des bactéries (Midelet & Carpentier, 2004; Simões et al., 2006). Plusieurs stratégies de contrôles des biofilms ont été effectuées comme le recouvrement des surfaces avec un agent antimicrobien (Thouvenin et al., 2003) ou en modifiant les propriétés physicochimiques des surfaces (Rosmaninho et al., 2007). Costerton a émis l'hypothèse que les liens ioniques, entre les agents bactéricides et la matrice extracellulaire, causaient la diminution des agents bactéricides dans la profondeur du biofilm.

Hetrick et son équipe ont regardé l'effet des nanoparticules de silice couplées au NO sur des biofilms. L'effet sur les bactéries planctoniques est connu pour ces nanoparticules, mais très peu d'études ont été effectuées sur les biofilms. Ils ont remarqué que ces NPs étaient efficaces à tuer les bactéries (> 99.999%). Ils ont remarqué que lorsque le NO est délivré rapidement, son effet est plus notable sur les biofilms que lorsqu'il est libéré doucement (Hetrick et al., 2009). L'équipe de Kalishwaralal a étudié l'effet des NPs d'argent sur le biofilm de *Pseudomonas*

aeruginosa et *Staphylococcus epidermis* car ces deux souches causent des biofilms sur les lentilles oculaires. Les NPs d'argent agissent comme un traitement préventif contre la formation de biofilm. Les NPs d'argent arrivaient à réduire la croissance des bactéries pour des concentrations de 100nM (Kalishwaralal, BarathManiKanth, Pandian, Deepak, & Gurunathan, 2010). D'autres NPs d'argent préviennent la formation de biofilms des bactéries à Gram négatif (Radzig et al., 2013). Une autre étude a démontré des résultats similaires pour les NPs d'argent sur le biofilm de la souche *Pseudomonas putida* (Frabrega, Renshaw, & Lead, 2009), d'autres ont remarqué aussi la prévention de la formation de biofilm avec des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs)(E. Taylor & T. J. Webster, 2011). Les SPIONs ont la particularité d'entrer en profondeur dans le biofilm grâce à leur propriété magnétique (E. Taylor & T. J. Webster, 2011; E. N. Taylor & T. J. Webster, 2011). L'équipe de Khan a étudié les nanoparticules de cuivre et les nanoparticules de zinc sur la formation de biofilms. Ils ont remarqué une inhibition de la croissance des bactéries planctoniques de 30% pour les NPs de zinc et 66% pour les NPs de cuivre. Ils ont remarqué aussi une inhibition de la formation de biofilm aussi, mais à des concentrations plus élevées que celles utilisées pour les bactéries planctoniques (10 fois plus élevée) (Tabrez Khan, Ahamed, Al-Khedhairi, & Musarrat, 2013).

La résistance des bactéries aux antibiotiques traditionnels est une menace grandissante. Les méthodes pour contrôler et prévenir les infections contractées dans les hôpitaux sont très variables et très complexes autant que les infections elles-mêmes. Les solutions peuvent venir des aspects du génie de l'architecture de l'hôpital à la maintenance de celui-ci (l'architecture actuelle n'empêche pas la circulation des bactéries aéroportées), aux décisions politiques concernant la vaccination, et à l'hygiène du personnel et des patients (Breathnach, 2013). Actuellement, l'engouement des chercheurs se concentre sur l'utilisation de nanoparticules. Ces particules sont connues pour induire une toxicité sur les bactéries. Nous, nous sommes intéressés sur plusieurs nanoparticules et leurs effets sur les bactéries (nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre sachant que le cuivre (sous forme macro) est utilisé depuis l'antiquité contre les bactéries, oxyde de fer).

1.3 État des connaissances

1.3.1 Les nanoparticules

Le domaine de la nanotechnologie est défini comme la combinaison de la science et de l'ingénierie. La nanotechnologie peut toucher aussi bien le design, la synthèse et caractérisation des particules (Sahoo, Parveen, & Panda, 2007). Avec les problèmes de résistance aux antibiotiques, les nanoparticules sont devenues une stratégie prometteuse pour détruire des bactéries. Les nanoparticules sont définies comme étant des particules ayant une taille de l'échelle nanométrique (entre 1 et 100nm soit 10^{-9} d'un mètre) (Laurent & Mahmoudi, 2011; Moore, 2006; Wahajuddin & Arora, 2012; Wu, He, & Jiang, 2008). Les chercheurs ont un réel engouement pour les nanoparticules en grande partie pour la toxicité des nanoparticules envers les bactéries. L'application des nanomatériaux comme de nouveaux antimicrobiens pourrait fournir des modes d'action et différentes cibles cellulaires comparés aux antibiotiques classiques.

Cependant, les propriétés nanométriques sont très mal connues, les chercheurs essaient de déterminer l'impact possible toxique des NPs sur les microorganismes et les mécanismes de toxicité qui sont utilisés (Adams, 2006 ; Zhang, 2007 ; Jiang, 2009)(Hajipour et al., 2012). Leur toxicité dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques telles que leur forme (cubique, sphérique) (Wahajuddin & Arora, 2012), leurs caractéristiques de surface (Nhien et al., 2010; Szalay, Tatrai, Nyiro, Vezer, & Dura, 2012; Wahajuddin & Arora, 2012), leur attraction électrostatique (Stoimenov et al., 2002; Morones et al., 2005; Adams et al., 2006; Zhang et al., 2007; Heinlaan et al., 2008; Huang et al., 2008; Neal, 2008; Aruoja et al., 2009), leur taille (Wahajuddin & Arora, 2012)) et aussi à la composition des nanoparticules (Aruoja, Dubourguier, Kasemets, & Kahru, 2009)(Jiang et al, 2009). Les chercheurs supposent que l'effet antimicrobien peut être aussi dû au type d'espèces microbiennes étudiées (Gram positif ou Gram négatif) (Jiang, 2009).

Il est connu que plusieurs nanoparticules (argent, zinc, cuivre) sont toxiques pour les bactéries. L'effet bactéricide des nanoparticules d'oxydes métalliques (Jiayin et al., 2010) a été rapporté sur les souches *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Staphylococcus aureus* (Huang et al., 2010; Morones et al., 2005). Plusieurs travaux s'intéressent au développement de surface antimicrobienne pour des applications médicales.

Jiang et collègues ont émis l'hypothèse que les NPs ont tendance à s'agréger et à s'attacher à la surface bactérienne, ce qui contribuerait à la toxicité des NPs. Les NPs ont été observées à l'intérieur des bactéries (Morones et al., 2005). Une fois à l'intérieur, elles se dissolvent induisant une libération d'ions (Moore, 2006). L'hypothèse la plus communément retrouvée chez les chercheurs pour le mécanisme de toxicité est la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) (Choi & Hu, 2009; Moore, 2006). Les ERO intracellulaires comme le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot) sont normalement retrouvés à de faibles concentrations dans les organismes vivants (Choi & Hu, 2009). Sous un stress oxydant, la concentration en ERO intracellulaires va augmenter causant plusieurs dommages cellulaires (Choi & Hu, 2009). La compréhension du stress oxydant nécessite la connaissance des effets des diverses ERO. L'excès des radicaux libres non neutralisés par les défenses de l'organisme peut conduire à la mort cellulaire. Cependant, les mécanismes physico-chimiques se produisant à l'interface nanoparticules/cellules et responsables sans doute de ce stress oxydant restent encore mal connus.

1.3.2 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre

1.3.2.1 Généralités

Le cuivre est un oligo-élément (Rakhmetova et al., 2010), présent dans l'organisme à faible concentration (1.5 à 3 mg/kg/jour apport quotidien) et sans lequel la vie ne serait pas possible. Le cuivre est nécessaire au bon fonctionnement de certains enzymes. Il est essentiel et nécessaire pour la stimulation du système immunitaire contre les infections et un élément essentiel pour maintenir l'homéostasie. Cependant, pour les bactéries, le cuivre n'est pas un élément essentiel. Il joue un rôle bénéfique pour les organismes supérieurs (animaux) et non pour les organismes inférieurs (virus et bactéries). Donc sa présence à l'intérieur de la cellule est considérée comme étrangère. Il est connu toxique envers les microorganismes (Ren et al., 2009; Ruparelia, Chatterjee, Duttagupta, & Mukherji, 2008).

1.3.2.2 Effets antibactériens

Alors que les métaux d'argent et les ions d'argent ont été les premiers à être utilisés comme agent antimicrobien, des évidences montrent que les agents antimicrobiens à base de cuivre seraient plus efficaces que l'argent, en offrant des avantages comme la réduction des coûts et des effets toxiques sur les cellules eucaryotes (Cady, Behnke, & Strickland, 2011; George Han et al., 2009; Hostynek & Maibach, 2004).

L'effet antimicrobien des nanoparticules de cuivre contre de nombreux organismes a été rapporté dans diverses études (Esteban-Cubillo, Pecharromán, Aguilar, Santarén, & Moya, 2006; Ren et al., 2009; Ruparelia et al., 2008; Yoon, Hoon Byeon, Park, & Hwang, 2007). Plusieurs paramètres rentrent en considération pour l'augmentation de l'effet antimicrobien des NPs de cuivre et oxyde de cuivre. Yoon a regardé l'effet antibactérien des nanoparticules d'argent et de cuivre sur les souches *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Il remarque que le ratio des bactéries mortes augmente lorsque les concentrations de NPs augmentent. (plus de 70, 80µg/mL) (Yoon et al., 2007). D'autres nanoparticules de cuivre et d'argent ont été étudiées par l'équipe de Ruparelia, et les conclusions sont similaires à l'équipe de Yoon. Il conclut que les effets antibactériens des nanoparticules de cuivre et argent sont dépendants de la concentration des nanoparticules et de la concentration en bactéries initialement (Ruparelia et al., 2008).

Malgré la même composition des particules, la taille de ces dernières joue un rôle très important. Les nombreuses études tentant d'établir une relation dose/réponse ont révélé l'importance de la taille de la NP et/ou de sa surface (Wahajuddin & Arora, 2012). Des résultats de recherches ont démontré que les particules nanométriques, contrairement au cuivre libre, avaient une toxicité plus élevée sur les bactéries planctoniques (Hanna L. Karlsson, Cronholm, Gustafsson, & Moller, 2008; H. L. Karlsson, Gustafsson, Cronholm, & Moller, 2009; Kasemets, Ivask, Dubourguier, & Kahru, 2009; Midander et al., 2009). Comme les effets cytotoxiques reflètent les dommages induits par les particules, une équipe a déterminé la cytotoxicité des NPs de cuivre en les comparant aux effets des microparticules (MPs) de cuivre ainsi que du cuivre libre sur l'espèce bactérienne *E.coli* RFM443. Les NPs et les MPs de cuivre ont des tailles de 90nm et 10µm respectivement et sont homogènes, grandement cristallins. Les NPs de Cu démontrent la toxicité la plus élevée comparée aux deux autres types de particules. Comparées aux NPs, les MPs ont montré des effets sur les cellules totalement différents et pas de réponses évidentes sur les espèces n'est observé (Kasemets et al., 2009).

1.3.2.3 Mécanismes d'action

Plusieurs études de toxicité antibactérienne des NPs n'ont pas contrôlé les paramètres physico-chimiques des NPs, et souvent n'ont pas considéré les mécanismes d'action. Le tableau comparatif en Annexe (Annexe 2) rassemble des informations sur la taille, la concentration des NPs utilisées, la méthode de synthèse des NPs ainsi que le temps d'incubation de plusieurs auteurs utilisant les NPs de Cu et CuO comme agent antibactérien. Tous ces paramètres influencent la toxicité des NPs envers les bactéries expliquant les différents rapports contradictoires sur l'effet bactéricide des NPs de cuivre et d'oxyde de cuivre. Il y a une nécessité de poursuivre les recherches en vue de comprendre l'effet des NPs de cuivre et d'oxyde de cuivre. Des études montrent que l'ADN est endommagé à cause du stress oxydant, à une concentration de NPs de Cu de 80µg/mL. Les dommages sur l'ADN des NPs de CuO sont plus importants que ceux effectués par les MPs de CuO. Dans toutes les études, les NPs de CuO étaient constamment plus cytotoxiques et induisaient plus de dommages oxydants sur l'ADN que les ions libérés par les nanoparticules elles-mêmes. Cependant les ions libres de cuivre peuvent endommager les protéines et la membrane à de hautes concentrations (supérieur à 140 mg L⁻¹) (Stohs & Bagchi, 1995; Verhaegh, Richard, & Hainaut, 1997), auraient une grande affinité pour les molécules riches en électrons comme l'ADN (Jose, Santra, Mandal, & Sengupta, 2011) et utiliseraient le stress oxydant (Cioffi et al., 2005).

Après toutes ces conclusions effectuées par différentes études, les mécanismes derrière l'induction de dommages sur l'ADN ne sont pas très clairs, mais les ions libérés de Cu ne semblent pas être le facteur causatif pour le stress oxydant in vitro. Il est clair que les NPs de CuO induisent du stress oxydant. Une étude récente a montré que les NPs de CuO reproduisent de hautes concentrations des espèces réactives d'oxygènes (ERO) et altèrent les enzymes antioxydants (catalase, glutathione peroxydase) (Fahmy & Cormier, 2009). Alors que les NPs de Cu causent différents types de dommages (stress oxydant, dommages de l'ADN, dommages de la membrane, et des protéines) à de basses concentrations (maximum de 80 mg/L). Les nanoparticules de cuivre induisent non seulement le stress oxydant pour l'espèce *E.coli*, mais aussi des dommages aux protéines, ADN, et la membrane cellulaire ainsi que l'inhibition de la croissance cellulaire (Ren et al., 2009; Ruparelia et al., 2008). Les NPs métalliques et d'oxydes métalliques comme le CuO entre dans les cellules (Fahmy & Cormier, 2009; Ludwig K, Peter, Pius, Robert N., & Wendelin J., 2007) et sont prises par les lysosomes. L'environnement acide

des lysosomes cause la dégradation des NPs de CuO en ions de cuivre. Les ions de Cu catalysent la formation du radical hydroxyde ($\cdot\text{OH}$) en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le OH généré attaque l'ADN si proche du noyau. L'autre mécanisme potentiel des NPs de CuO pour endommager l'ADN est basé sur les NPs de CuO qui entrent directement dans la cellule et interagissent avec les mitochondries et induisent la dépolarisation mitochondriale (Fahmy & Cormier, 2009; H. L. Karlsson et al., 2009). Cette dépolarisation induit une perte de la membrane mitochondriale, l'interruption de la chaîne de transport des électrons, et la libération des ERO dans le cytoplasme. Bien qu'il n'y ait pas d'études *in vivo* sur les mécanismes d'endommagement de l'ADN par les NPs de CuO, notre laboratoire est actuellement en train d'examiner les mécanismes des NPs de CuO à induire des dommages sur l'ADN dans les plantes.

Les NPs de cuivre sont utilisées pour le développement d'une nouvelle génération de médicaments et des matériaux composites pour la médecine et l'agriculture (Cioffi, 2005 ; Rakhmetova), qui nécessitent l'identification de mécanismes des activités biologiques. Le choix du cuivre dans la présente recherche est attribué aux facteurs mentionnés plus haut. De plus, les nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre sont connues pour avoir une activité antimicrobienne contre un grand nombre d'espèces bactériennes (*E. coli* and *Staphylococcus*) (Azam, Ahmed, Oves, Khan, & Memic, 2012; Ren et al., 2009; Ruparelia et al., 2008).

1.3.3 Nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer

1.3.3.1 Généralités

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des semi-conducteurs, c'est-à-dire qu'il y a une conductivité électrique due au flux d'électrons. Les oxydes de fer sont connus sous différentes formes : hématite (Fe_2O_3 , phase alpha), maghémite (Fe_2O_3 , phase gamma) et magnétite (fer (II, III), Fe_3O_4) (M. M. Rahman, Khan, Jamal, Faisal, & Aisiri, 2011; Teja & Koh, 2009; Wahajuddin & Arora, 2012; Wu et al., 2008). Dans notre projet, nous avons utilisé les magnétites.

Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs) ont des propriétés intéressantes pour diverses applications médicales comme le ciblage de drogue, la résolution d'imagerie, et la réparation de tissu (Hajipour et al., 2012; M. Mahmoudi, Simchi, Milani, & Stroeve, 2009). Dans le cas de ciblage de drogues, les nanoparticules peuvent être dirigées avec

un champ magnétique jusqu'au site désiré (M. Mahmoudi et al., 2009; Nhiem et al., 2010; Prucek et al., 2011; Szalay et al., 2012; Teja & Koh, 2009; Wahajuddin & Arora, 2012; Wu et al., 2008). L'atome de fer possède un moment magnétique très fort à cause de ces 4 électrons de la troisième orbite. Un matériau détenant un seul domaine magnétique n'a pas de boucle d'hystérèse et est dit superparamagnétique comme les nanoparticules utilisées pour ce projet. Les SPIONs) utilisent le phénomène de superparamagnétisme, lorsqu'appliqué à un champ magnétique externe, jusqu'à saturation. Cependant, dès que le champ magnétique est arrêté, il n'y a plus d'interaction magnétique (Wahajuddin & Arora, 2012). Ce genre de comportement est surtout retrouvé chez les nanoparticules d'oxyde de fer plus petites que 20nm (Teja & Koh, 2009; Wahajuddin & Arora, 2012). Les propriétés magnétiques des oxydes de fer sont exploitées dans diverses applications : contraste pour le IRM, et le traitement de cancer. Cependant, nous remarquons que l'effet hyperthermique des SPIONs sur les bactéries n'a pas encore été étudié. Toutes ces applications sont dépendantes de certains paramètres des nanoparticules comme leur taille, leur forme, leurs caractéristiques de surface, et leurs propriétés magnétiques (Teja & Koh, 2009). Les SPIONs sont connues pour être biocompatibles (Morteza Mahmoudi & Serpooshan, 2012; M. Mahmoudi et al., 2010; Mbeh et al., 2012; Nhiem et al., 2010; Prucek et al., 2011; Szalay et al., 2012; Teja & Koh, 2009; Wu et al., 2008), car cette particule est un métabolite (Fe) supposément bioinerte et est un élément essentiel pour les organismes vivants (Mbeh et al., 2012).

1.3.3.2 SPIONs recouverts

Peu de recherches sont effectuées sur des nanoparticules d'oxyde de fer pures sachant que les SPIONs ne sont pas connus pour avoir une activité antibactérienne importante (T. Gordon et al., 2011). Plusieurs chercheurs utilisent la biocompatibilité des SPIONs pour délivrer un agent antimicrobien (anticorps pour traitement du cancer, molécule antimicrobienne) (Laurent & Mahmoudi, 2011; M. Mahmoudi, Sant, Wang, Laurent, & Sen, 2011) en effectuant un recouvrement de la particule (avec de l'argent, de l'or, zinc, PEG) (T. Gordon et al., 2011; Morteza Mahmoudi & Serpooshan, 2012; Nhiem et al., 2010; Wahajuddin & Arora, 2012; L. Wang et al., 2011). Les nanoparticules deviennent alors un véhicule pour conduire la bonne molécule au site voulu. Gordon et al (T. Gordon et al., 2011), eux recouvrent les SPIONs avec du zinc. Ils remarquent que malgré la non-toxicité de SPIONs seules, ces dernières possèderaient un

pouvoir catalytique et réduiraient le H_2O_2 en la formation de radicaux libres. Cette caractéristique augmenterait la toxicité antibactérienne du zinc. Leurs résultats montrent bien que l'oxyde de fer seul n'a pas d'effet significatif sur la croissance bactérienne d'*E.coli* et *S.aureus*. Le zinc seul tue les bactéries. Les chercheurs ont regardé différents ratios de zinc à la surface des SPIONs. Plus il y avait de zinc plus les NPs étaient toxiques. Cela dit cette diminution de la croissance bactérienne est moins importante que celle du zinc seul, mais plus élevée que celle de l'oxyde de fer (T. Gordon et al., 2011). Tran et al, quant à eux ne voient pas de différence significative dans la croissance de *S.aureus*. Leurs particules sont recouvertes d'un polymère (PEG). Cependant, à une très haute concentration de SPIONs (3mg/mL), le ratio de cellules bactériennes vivantes/mortes a baissé comparé au temps 0 (Nhiem et al., 2010). Mahmoudi et al ont remarqué que les SPIONs recouverts d'argent ou une combinaison d'argent et or, n'étaient pas toxiques envers les cellules. Ils ont observé que contrairement aux nanoparticules d'argent, les SPIONs recouverts d'argent n'entraient pas dans les mitochondries. Et donc ne produisaient peu ou pas d'espèces réactives d'oxygènes (ROS) (Hajipour et al., 2012; Morteza Mahmoudi & Serpooshan, 2012; M. Mahmoudi et al., 2009). Dans les différentes études, il semblerait que le mécanisme d'action des SPIONs couplées à un autre métal ou molécule utiliserait le stress oxydant pour tuer les bactéries.

1.3.3.3 Mécanismes d'action

Des chercheurs supposent que les SPIONs génèreraient des ROS (espèces réactives d'oxygène) (Miao, Soo, Zhenmeng, Alison, & Hong, 2012) qui pourraient être la cause de la mort des bactéries sans que cela soit toxique pour les cellules eucaryotes (Mbeh et al., 2012; Nhiem et al., 2010). L'équipe de Gokulakrishnan a étudié plusieurs nanoparticules (oxyde de fer, oxyde de magnésium, oxyde d'aluminium, dioxyde de zirconium) sur différentes souches bactériennes (*S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus sp*). Ils ont remarqué que dépendamment de la souche étudiée, les nanoparticules n'agissaient pas de la même manière (Gokulakrishnan, Ravikumar, & Raj, 2012).

Les SPIONs sont considérés être biocompatibles. Cela en fait un candidat idéal pour les applications biomédicales (lorsque mis en contact avec l'humain). Cependant, les SPIONs n'ont pas d'effets antimicrobiens élevés contrairement aux autres nanoparticules métalliques (cuivre,

argent ou zinc) (Azam, Ahmed, Oves, Khan, Habib, et al., 2012). L'intérêt est de trouver une manière d'utiliser ces nanoparticules pour leur biocompatibilité et de les fonctionnaliser avec une molécule ou un agent antibactérien.

1.3.4 Le monoxyde d'azote

1.3.4.1 Généralités

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule versatile, petite et instable qui est générée enzymatiquement à l'intérieur des cellules eucaryotes et bactériennes (Bryan & Grisham, 2007; P. Cabrales, 2011; Hunter, Storm, Coneski, & Schoenfisch, 2013).

La synthase du monoxyde d'azote (nitric oxide synthase, NOS) produit le NO (Hunter et al., 2013), en présence d'oxygène et d'acides aminés L-arginine. Les bactéries peuvent aussi produire le NO, car elles détiennent aussi la synthase. Cependant, les bactéries ne détiennent pas un domaine essentiel de la réductase pour compléter la production de NO. Les bactéries doivent donc utiliser celle des cellules eucaryotes (Jones, Ganopolsky, Labbe, Wahl, & Prakash, 2010). Gusarov et collègues (Gusarov, Shatalin, Starodubtseva, & Nudler, 2009) ont observé qu'à des concentrations faibles de NO, produit par la synthase bactérienne, permettrait de protéger les bactéries contre le stress oxydatif dû à l'utilisation systémique des antibiotiques (augmentant la résistance des bactéries aux antibiotiques) (P. Cabrales, 2011; Jones, Ganopolsky, Labbe, & Prakash, 2010).

Le NO et les produits dérivés exercent une activité toxique envers les microbes. Le NO a plusieurs fonctions comme la régulation de la pression sanguine, le contrôle de l'agrégation des plaquettes, la protection contre les blessures vasculaires (Bryan & Grisham, 2007; Jones, Ganopolsky, Labbe, Wahl, et al., 2010; Macherla et al., 2012), la vasodilatation des muscles lisses, dans la neurotransmission, la guérison des plaies et le NO est utilisé comme agent antimicrobien par les cellules immunitaires (Bryan & Grisham, 2007; P. Cabrales, 2011; Carpenter & Schoenfisch, 2012; Hunter et al., 2013; Husain et al., 2008; Macherla et al., 2012; Schairer, Chouake, Nosanchuk, & Friedman, 2012; Seabra et al., 2014). Le NO in vivo a une grande réactivité avec une demi-vie très courte de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes (Coneski & Schoenfisch, 2012; Hunter et al., 2013). Le NO a aussi une diffusion très

rapide (Hunter et al., 2013). *In vivo*, les concentrations de NO varient énormément, allant d'une concentration picomolaire à micromolaire dépendamment de l'utilité du NO (Hunter et al., 2013) rendant ainsi la concentration optimale à utiliser très difficile. Il existe différentes plateformes pour libérer le NO en utilisant différents donneurs de NO (P. Cabrales et al., 2010; Friedman et al., 2008; Kim, Saravanakumar, Choi, Park, & Kim, 2014). Les donneurs de NO comme les diazéniumdiolates, S-nitrosothiols, les complexes métal-nitrosyl et les dérivés de nitrobenzène vont être attachés à différents véhicules (qui peut aller de petites molécules à des matériaux inorganiques) (P. Cabrales et al., 2010; Friedman et al., 2008; Kim et al., 2014). Au LIAB, Zhang et (2012) ont étudié la faisabilité de délivrer le NO par des SPIONS fonctionnalisés avec de la silice (SiO₂) (Zhang et al., 2012).

1.3.4.2 Effets antibactériens

Il y a plus de 50 ans, le monoxyde d'azote était utilisé pour prévenir les détritits provenant de la viande (Ghaffari, Miller, McMullin, & Ghahary, 2006). Le NO libéré du nitrite de sodium dans un milieu acide aurait été la cause de l'effet bactériostatique. Des études ont permis de conclure que le NO aurait un effet bactériostatique et pourrait même avoir un effet bactéricide (Ghaffari et al., 2006). Les chercheurs s'intéressent grandement à la toxicité du NO, car chez les mammifères, les macrophages et autres cellules immunitaires (F. C. Fang, 2012) produisent cette molécule en réponse à l'invasion des pathogènes microbiens (Deupree & Schoenfisch, 2009). Les sites connus de colonisation bactérienne comme dans le nasopharynx (grande quantité de bactéries *S.aureus*), il est possible de retrouver d'importante quantité de NO. Les effets antimicrobiens du NO ont été d'abord examinés avec du NO gazeux (gNO). Cela inhibait la croissance des bactéries, champignons, mycobactéries, parasites et virus. Le flux du NO était contrôlé par une chambre spécialisée et permettait de prévenir les réactions des espèces réactives d'oxygène avec le NO (Schairer et al., 2012). L'équipe de McMullin (Ghaffari et al., 2006) aussi a exposé du NO gazeux (200ppm) à des souches bactériennes. Ils ont remarqué un effet bactéricide à 100% pour la souche *S.aureus* après 4h d'exposition. Une étude remarque que les bactéries ne sont pas susceptibles à de faibles concentrations de NO (0.1 à 1.4ppm), cela n'affectait pas leur croissance (Mancinelli & McKay, 1983). L'équipe de Seabra a utilisé les nanoparticules d'oxyde de fer et les ont fonctionnalisées avec du NO. Pour faire la nitrosation, ils

ont utilisé deux molécules thiolées (DMSA et MSA). Ils supposent que la concentration de NO à la surface des NPs est de $40 \pm 7 \mu\text{mol}$ pour les SPIONs fonctionnalisées au NO à l'aide de MSA, et $105 \pm 8 \mu\text{mol}$ pour les SPIONs fonctionnalisées au NO à l'aide de DMSA (Seabra et al., 2014). L'équipe de Friedman utilise des composés de verres et hydrogel comme NPs sur lesquelles il ajoute le NO afin d'inhiber l'agrégation des plaquettes. Ils ont pu déterminer qu'après 10min environ 70nM de NO se libéraient chaque minute, après 100min, 180nM se libéraient par minute et après 200min 215nM se libéraient par minute en utilisant la méthode ampérométrique, utilisation de Apollo 4000 (Blecher et al., 2012). L'équipe de Cabrales utilise les mêmes nanoparticules composées de verre et hydrogel, mais détermine la libération de NO avec une autre méthode, la chimiluminescence. Elle utilise de donneurs de NO les NONOates et le DPTA NONOates. Le premier libère $10.7 \mu\text{mol}$ de NO/mg tandis que le deuxième libère $9.4 \mu\text{mol}$ de NO/mg (P. Cabrales et al., 2010). Le groupe de Friedman (George Han et al., 2009) a observé l'effet du NO sur les bactéries connues causant les infections nosocomiales comme *S.aureus in vitro*, et la souche résistante à la methicilline *S.aureus* MRSA in vivo. Ils ont libéré le NO (75nM libération initiale et une libération continue de 50nM) à l'aide de 5mg/mL de nanoparticules à base d'hydrogel. Ils ont observé une activité antimicrobienne contre ces bactéries dans une souris blessée (George Han et al., 2009). Le NO in vivo a une grande réactivité avec une demi-vie très courte de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. Le NO a aussi une diffusion très rapide (Hunter et al., 2013). Toujours *in vivo*, les concentrations de NO varient énormément, allant d'une concentration picomolaire à micromolaire dépendamment de l'utilité du NO (Hunter et al., 2013) rendant ainsi la concentration optimale à utiliser très difficile.

1.3.4.3 Mécanismes d'action

L'équipe de Schoenfish (Deupree & Schoenfish, 2009) a analysé la morphologie des bactéries après un traitement nanoparticules libérant du NO. Les effets ont été remarqués pour la souche *E.coli* et *P.aeruginosa*. Il y avait lyse bactérienne et un effondrement de la membrane (Deupree & Schoenfish, 2009). Des débris cellulaires étaient observables ainsi qu'une diminution de la croissance cellulaire. Le groupe de Friedman (George Han et al., 2009) a observé l'effet du NO sur les bactéries connues causant les infections nosocomiales comme *S.aureus in vitro*, et la souche résistante à la methicilline *S.aureus* MRSA in vivo. Ils ont libéré le

NO (75nM libération initiale et une libération continue de 50nM) à l'aide de 5mg/mL de nanoparticules à base d'hydrogel. Ils ont observé une activité antimicrobienne contre ces bactéries dans une souris ayant des abcès (George Han et al., 2009). Les effets antibactériens peuvent être induits par la modification des macromolécules ou par la formation d'espèces de nitrogène réactive (ERN) (Schairer et al., 2012). Ces ERN peuvent induire du stress nitrosatif qui rendra les bactéries plus vulnérables et seront ainsi détruites (Deupree, 2009). Le NO endommage l'ADN en trois mécanismes. Le premier est une réaction directe des ERN avec la structure de l'ADN. Le NO agit aussi de façon indirecte sur l'inhibition de la réparation de l'ADN en inhibant les enzymes associées à la réparation. Et le dernier mécanisme est l'augmentation des agents alcalins et du peroxyde d'hydrogène (produits génotoxiques) (Schairer et al., 2012).

Les produits associés au NO (peroxynitrite et dioxyde de nitrogène) endommagent aussi les lipides. Le peroxynitrite est connu pour être un médiateur de la peroxydation des liposomes qui contribue aux effets antibactériens du NO (Schairer et al., 2012). Le NO est un bon candidat pour la destruction des bactéries. Cependant, connaître la dose seuil qui permet de tuer les bactéries tout en n'ayant aucun effet toxique sur les cellules humaines est nécessaire. Dans le Laboratoire, LIAB, les chercheurs ont fonctionnalisé les SPIONS avec du NO afin de le libérer dans les alvéoles (Zhang et al., 2012).

CHAPITRE 2 OBJECTIFS

2.1 Hypothèses de recherche

L'argent a été l'un des premiers antimicrobiens utilisés historiquement, mais des études (Cady et al., 2011) montrent que les agents antimicrobiens à base de cuivre peuvent être plus efficaces que l'argent. Le cuivre est un oligo-élément contrairement à l'argent rendant ainsi le cuivre plus intéressant pour le domaine biomédical. Le cuivre aurait des avantages comme le coût inférieur à celui de l'argent et une réduction de l'irritation des cellules eucaryotes (Cady et al., 2011; Hostynek & Maibach, 2004). De plus, il est connu que la toxicité des NPs est dépendante du procédé de synthèse utilisé (Theivasanthi & Alagar, 2011), notamment des propriétés physico-chimiques des NPs. Dans ce projet, nous avons utilisé le procédé appelé « plasma induction » développé par la compagnie Tekna pour synthétiser les NPs de Cu et CuO. Aucune étude n'a regardé auparavant l'effet antibactérien des NPs de Cu et CuO synthétisées par cette méthode industrielle.

Nous, nous sommes intéressés aussi aux nanoparticules d'oxydes de fer (SPIONs) qui sont connues pour leur biocompatibilité (Mbeh et al., 2012). Elles possèdent d'autres propriétés qui peuvent être utilisées : leur magnétisme, un médiateur de chaleur dans les traitements hyperthermiques, des agents de contrastes pour l'IRM. Leur superparamagnétisme leur permet d'être facilement guidées au site voulu à l'aide d'un champ magnétique (Figuerola, 2010). Elles sont aussi de bonnes candidates pour la fonctionnalisation du monoxyde d'azote sur leur surface (Zhang et al., 2012). De plus, l'ajout de NO à leur surface devrait rendre leur toxicité plus élevée. Les macrophages utilisent dans leur armada antimicrobienne du monoxyde d'azote (James, 1995). Les propriétés des nanoparticules sont différentes de celles des matériaux d'une échelle micrométrique ou macrométrique (Christian, 2008 ; Farré, 2009). La toxicité des NPs est dépendante de plusieurs facteurs la taille des NPs. Nous avons également regardé la composition des NPs sachant que la couche d'oxydation sur les NPs réduirait leur toxicité (Miao et al., 2012). Actuellement, l'impact des NPs sur les biofilms n'est pas bien étudié. Ces informations nous ont permis d'exposer certaines hypothèses que nous avons essayé de répondre lors de cette maîtrise :

1. Ainsi nous supposons que les NPs de cuivre pur seraient plus toxiques contre les bactéries que celles d'oxyde de cuivre

2. Une de nos hypothèses est que les microparticules de cuivre auraient un effet toxique moindre comparé aux NPs de cuivre ou d'oxyde de cuivre
3. Nous supposons que les SPIONs seuls ne devraient pas avoir une toxicité importante sur les bactéries due à leur biocompatibilité connue (Mbeh et al., 2012), et devraient être beaucoup moins toxiques que les NPs de cuivre et oxyde de cuivre
4. Notre dernière hypothèse est que le NO est toxique pour les bactéries à une certaine dose.

2.2 Objectifs

2.2.1 Objectif général

L'objectif général à long terme vise à développer des "nano-biotiques" à base de nanoparticules métalliques afin de prévenir les infections nosocomiales liées à l'implantation chirurgicale. Dans ce projet de maîtrise, nous évaluerons in vitro l'effet antibactérien des nanoparticules (Cu, CuO, SPIONs, SPIONs+NO) sur des bactéries planctoniques.

2.2.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de ce projet sont:

- Développer un test microbiologique pouvant être utilisé pour étudier l'effet des différentes nanoparticules (SPIONs, SPIONs+ NO, Cu, CuO) sur les bactéries planctoniques ;
- Déterminer la concentration optimale des microparticules de cuivre et des nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre qui permet de tuer les bactéries planctoniques ;
- Déterminer la concentration optimale des nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre pour détruire les biofilms de l'espèce *S.aureus* ;
- Vérifier l'effet des SPIONs nus contre les bactéries ;
- Déterminer la concentration optimale des nanoparticules d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote qui permet de tuer les bactéries planctoniques ;

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Synthèse des nanoparticules

3.1.1 Oxyde de fer (SPIONs)

Synthèse du noyau des oxydes de fer Les nanoparticules d'oxydes de fer ont été synthétisées par notre collaborateur Dr Sophie Laurent (Laurent & Mahmoudi, 2011; M. Mahmoudi et al., 2011)(Université de Mons, Belgique). Les nanoparticules magnétiques (NPs) sont préparées par une co-précipitation de sels ferreux dans DEG (diéthylène glycol) en concordance avec le protocole décrit précédemment (Forge et al., 2008). Brièvement, un mélange de sel de tétra hydrate chlorure ferreux (45mmol ; 8.9g) et de chlorure ferrique (45%; 37 mmol; 9.1 ml) dans du DEG (250 ml) a été chauffé à 170 °C sous une atmosphère forte en azote tout en agitant. Après 15 min à cette température, l'hydroxyde de sodium: 915g) a été ajoutée afin de prévenir toute dilution. La solution a été agitée pendant 1h à 170 °C. Ce mélange a été refroidi et les particules magnétiques ont été isolées de la solution par décantation magnétique ($B_0 = 0.5$ T), après le précipité noir a été lavé cinq fois avec une solution aqueuse d'acide nitrique (200 ml, 1 M). Finalement, la magnétite a été dispersée dans de l'eau dé-ionisée, ultrasonnée (45 minutes), et centrifugée (16,500 G; 45 min) pour enlever tous agrégats.

3.1.2 Cuivre et oxyde de cuivre

Les nanoparticules de cuivre (Cu) et d'oxyde de cuivre (CuO) sont des poudres synthétisées par la compagnie TEKNA. Les microparticules (MPs) sont aussi des poudres synthétisées par TEKNA. Cette compagnie utilise une nouvelle méthode de synthèse appelée le plasma induction. Cette technique à l'avantage, de plus d'être une nouvelle technique, de produire des quantités commerciales de particules contrairement aux autres méthodes qui synthétiseraient plus pour des laboratoires de recherche.

Le plasma est considéré comme le quatrième état de la matière. Quand l'énergie est suffisante à la matière, le solide peut être fondu en liquide, le liquide s'évapore en gaz et le gaz peut être ionisé en plasma. Le plasma est donc un gaz composé d'ions (soit positifs soit négatifs), des électrons, et des atomes. Il y a deux types de plasma : le plasma froid et le plasma thermique. La torche du plasma, dont un brevet est détenu par la compagnie TEKNA, comporte ces différentes caractéristiques :

- Un tube de confinement en céramique du plasma permettant d'avoir une grande capacité d'un procédé pur
- Un corps solide la torche encapsulant la bobine d'induction qui facilite la manipulation durant la maintenance et permet d'assembler parfaitement la bobine
- Une position variable de la sonde d'injection centrale pour une performance optimale basée sur les besoins du procédé (Figure 3.1).

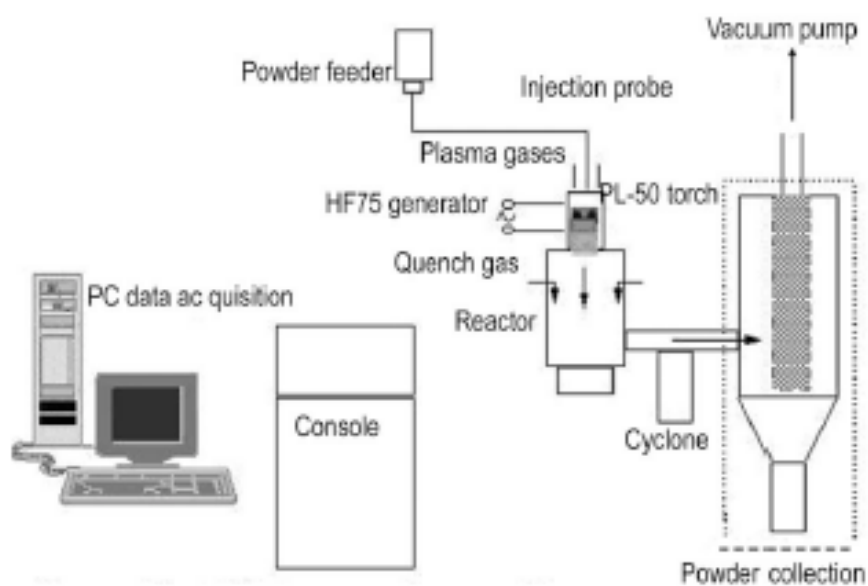


Figure 3.1: Schéma représentatif du mécanisme du procédé de plasma par induction (Jiayin et al., 2010)

Les matériaux nanométriques synthétisés par plasma par induction peuvent être faits de deux façons soit par un procédé physique (évaporation et condensation) soit chimique (évaporation, réaction et condensation) (Jiayin et al., 2010). Les poudres de NPs de Cu ont été

préparées avec le procédé physique (évaporation et condensation). La poudre de métaux doit être passivée lors de la préparation des NPs. La passivation peut être effectuée dans des conditions humides (immersion dans un liquide) ou dans des conditions sèches (oxydation contrôlée avec l'air). Les poudres d'oxyde de cuivre ont été synthétisées par premièrement à l'évaporation de la poudre de métal suivie d'une oxydation la vapeur du métal par le gaz plasma (air ou oxygène) et finalement par la condensation de la vapeur. Comme le cuivre possède deux états d'oxydation (ténorite CuO et cuprite Cu_2O) une tentative préliminaire a été faite afin de convertir le cuivre pur en ténorite. La conversion de ténorite en cuprite est déterminée par la concentration en oxygène dans le plasma et la température dans le réacteur (Jiayin et al., 2010). Le plasma induction permet d'avoir une productivité et un contrôle de la qualité sans générer de coûts élevés. Cette méthode permet d'avoir des particules très pures.

3.1.3 Fonctionnalisation des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer

Préparation des nanoparticules 5 ml d'une solution aqueuse de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.045 M) et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.0375 M) ont été rajoutés à 250 ml de diéthylèneglycol. Le mélange est chauffé à 170 °C et maintenu à cette température pendant 15 min avant d'ajouter la solution basique (i.e. solide NaOH jusqu'à une concentration finale de 0.375 M). La température a été maintenue à 170°C pendant une heure avant de refroidir la solution à 60 °C. Les SPIONs (Fe_3O_4) ont été collectés avec un aimant de neodymium et lavés avec 100 ml d'une solution de HNO_3 (1 M).

Nitrosation des SPIONs L'attachement covalent du NO à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer peut être obtenu faisant une nitrosation de groupes thiols livrés (-SH) à la surface des nanoparticules. Les nanoparticules d'oxyde de fer thiolées sont obtenues en faisant réagir les nanoparticules non recouvertes avec un thiol contenant un acide méso 2,3-dimercaptosuccinic (DMSA : $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{S}_2$) qui est un chélateur qui oxyde la surface des SPIONs pendant le procédé de fonctionnalisation) (Durmus, Taylor, Kummer, & Webster, 2013). DMSA est dissout dans l'eau et est mixé avec les nanoparticules à un pH 3 sous un flux d'azote, afin de prévenir la formation de liens désulfites. Le mélange est agité à la température ambiante pendant deux heures. Après lavage, les nanoparticules DMSA-oxyde de fer sont entreposées à 4 °C sous azote jusqu'à

utilisation. L'utilisation du DMSA, un chélatant métallique, permet la formation de particules de maghémite thiolées, stables dans une large échelle pH (3-11) dans une force ionique et dans divers tampons très souvent utilisés par les biochimistes. De plus, les groupes $-SH$ restent libres à la surface des nanoparticules permettant la nitrosation menant à la formation de groupes $-SNO$. La nitrosation des groupes de thiols à la surface des SPIONs est obtenue par l'immersion des nanoparticules thiolées dans une solution aqueuse acidifiée de nitrite de sodium pendant une heure. Après ce temps, les SPIONs nitrosés sont lavés avec de l'eau, puis filtrés pour enlever l'excédent de nitrite et sont maintenus au congélateur jusqu'à utilisation. Les groupes $-SNO$, formés à la surface des nanoparticules, agissent comme un donneur de NO spontané grâce à la cassure du lien $-S-N$.

3.2 Caractérisations des nanoparticules

3.2.1 TEM

La taille des NPs a été mesurée par la microscopie électronique en transmission. La microscopie électronique en transmission (TEM) (Figure 3.2) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers l'échantillon voulu. L'interaction entre les électrons et l'échantillon crée l'image. Les images obtenues ne sont pas explicites et doivent être interprétées à l'aide d'un support théorique. L'équipement utilisé est JEM-2100F (microscope d'émission d'électrons couplé à une résolution haute à 200kV et un champ d'image, École Polytechnique). L'analyse des éléments était faite avec EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). Le SAED (Selected Area Electronic Diffraction) a été utilisé pour la diffraction d'électrons. Les SPIONs ainsi que les NPs de Cu et CuO ont été diluées dans de l'eau avant la préparation et une sonication durant 3 minutes a été effectuée pour réduire la densité des particules et ainsi éviter l'agglomération des particules. Une goutte de chaque échantillon a été étalée sur une grille de nickel et couverte avec un verre jusqu'à obtention d'échantillon sec sur la grille. Les mesures peuvent être prises (Z. L. Wang, 2000)



Figure 3.2: Photo du TEM (Centre de Caractérisation Microscopique des Matériaux, École Polytechnique).

3.2.2 FTIR

La FTIR est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé (Figure 3.3). Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques d'identifier les fonctions chimiques présentes. Les mesures par transformée de Fourier des absorbances permet d'en effectuer le dosage à des teneurs et quantités de matières très faibles. On accède ainsi directement à la structure moléculaire des matériaux analysés. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, « Fourier Transform InfraRed spectroscopy ») est une technique de spectroscopie permettant d'obtenir un spectre d'adsorption, émission, photoconductivité ou diffusion de Raman dans l'infrarouge d'un échantillon. Il est nécessaire de passer par la transformée de Fourier pour convertir les données en un résultat spectral.



Figure 3.3: Photo du FTIR à l'École Polytechnique

3.2.3 XRD

La cristallographie aux rayons X ou diffractométrie de rayons X est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffractométrie de rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique. Elle ne fonctionne que sur la matière cristallisée (minéraux, métaux, céramiques). Par contre, elle permet de reconnaître des produits ayant la même composition chimique brute, mais une forme de cristallisation différente, par exemple de distinguer les différentes silices (qui ont toutes la même formule brute SiO_2 : quartz, cristobalite) ou les différents aciers (acier ferritique, austénite). Dans cette étude, la pureté et les phases de cristaux des couches de CuO et Cu_2O ont été examinées par XRD. L'acquisition des données de XRD a été faite par le diffractomètre X'Pert de Philips avec la radiation de $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ à 50 kV et 40 mA) dans une échelle de 20° à 90° . L'analyse des données a été faite par le programme Panalytical X'pert Highscore Plus.

3.2.4 Apollo

Apollo est une machine qui permet de mesurer le NO (Figure 3.4). Apollo 1000 consiste à convertir le signal reconnu par le capteur en un voltage. Ce voltage est ensuite filtré et peut être lu par le logiciel. L'équipe de Friedman considère que cette technique est la plus fiable pour la mesure du NO (Blecher et al., 2012; Friedman et al., 2008; George Han et al., 2009).



Figure 3.4: Photo de Apollo 1000 (École Polytechnique)

3.3 Tests microbiologiques

3.3.1 Choix des bactéries

Nous avons porté notre choix sur des bactéries représentatives des souches causant les infections nosocomiales (Arciola, Campoccia, Speziale, Montanaro, & Costerton, 2012) : une souche représentative des bactéries à Gram négatif *E.coli* (ATCC10798) et une souche représentative des bactéries à Gram positif *S.aureus* (souche clinique d'un patient atteint de sinusite chronique, Université de Montréal) (Bendouah, Barbeau, Hamad, & Desrosiers, 2006).

3.3.2 Préparation des bactéries

Les bactéries sont conservées à -80°C (15% de glycérol). Avant chaque expérience, les bactéries sont décongelées (500µL) et suspendues dans 10mL de TSB (milieu de culture). Elles sont ensuite mises à incuber pendant 24h à 37°C.

Une lecture de la Densité Optique (DO ; Thermospectronic) est faite à une longueur d'onde de 660nm. Ensuite nous ajustons la suspension bactérienne à 0.75A (λ 660nm) dans du PBS. Des comptes viables ont été effectués sur chaque souche bactérienne pour déterminer le nombre de bactéries qui se trouvent dans une suspension à 0.75A. À l'aide de ces données et de la lecture de DO, il est possible de déterminer le nombre de bactéries se trouvant dans l'échantillon que l'on veut étudier. Par la suite, les deux suspensions bactériennes (*S.aureus* et *E.coli*) sont centrifugées pendant 10 min à vitesse maximale de 8500rpm (IEC Centrifugeuse clinique). Deux lavages sont effectués avec 10mL de PBS à pH 7.2. Après le dernier lavage, les suspensions (dans le PBS à pH 7.2) sont passées au bain ultrasonique (Cole-Parmer, 8890) pendant une minute afin d'éliminer toute agglomération de bactéries.

3.3.3 Tests antimicrobiens

Il existe trois méthodes pour déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un agent antimicrobien : la diffusion en disque, la dilution liquide et la dilution solide. Ces trois méthodes permettent de déterminer la concentration minimale d'inhibition (CMI). La CMI, comme son nom l'indique, est la concentration minimale qui permet une inhibition de la croissance bactérienne (bactériostatique) après 24h de contact. La méthode de diffusion en disque est la dilution d'un agent antimicrobien à une concentration spécifique (sur un disque) sur une gélose solide qui a été préalablementensemencée de la souche bactérienne voulue. Lorsque le disque de l'agent antimicrobien est sur la gélose, un gradient de la concentration de l'antibactérien se forme. Lorsque la concentration est trop diluée, l'antimicrobien ne peut plus inhiber la croissance bactérienne. Se forme ainsi la zone d'inhibition. Une corrélation existe entre le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI. Néanmoins la détermination par cette méthode est insatisfaisante, d'où la nécessité de recourir à la méthode directe par dilution. Nous avons opté pour la méthode de dilution liquide, car elle semble être plus reproductible et quantitative que la méthode de

diffusion en disque. La méthode de dilution liquide consiste à observer une suspension bactérienne qui a été mise en contact avec différentes concentrations d'agent antimicrobien dans un milieu liquide. Après avoir déterminé la CMI d'une souche bactérienne, il est possible de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) à 99.99%. Le tube qui ne présente aucune croissance va être ensemencé pour déterminer le nombre de survivants. L'agent antimicrobien est dit bactéricide si le nombre de survivants ne dépasse pas les 0.01%.

3.3.3.1 Microparticules de cuivre

La concentration minimale inhibitrice (CMI) consiste à mettre en contact les bactéries avec différentes concentrations de particules pendant 24 h. Après ce temps, il est possible de voir la première concentration qui induit une inhibition des bactéries. Cette concentration est alors la CMI. Les MPs sont à une concentration de 6mg/mL (dans un tube stérile 10mL). Une dilution sériée, dans des tubes à essais de 5mL contenant 450 μ L de protéose peptone, est effectuée pour obtenir les autres concentrations de 6, 3, 1.5, 0.75, 0.325, 0.125mg/mL. Cent microlitres de la suspension bactérienne à une concentration de 10^7 UFC/mL (tube à essais de 5mL contenant 1mL de la suspension) sont aussi déposés pour chaque dilution (pour une concentration finale 10^6 UFC/mL). Chaque dilution est incubée pendant 24 h à 37°C. Après l'incubation, le tube qui ne semble pas présenter de croissance bactérienne (CMI) est utilisé. Cent microlitres de ce tube sont ensemencés afin de déterminer si les MPs s'il y a croissance ou non.

3.3.3.2 Nanoparticules d'oxyde de fer

Dans la littérature la plupart des chercheurs ont observé l'effet des NPs à une concentration de 3mg/mL (Nhiem et al., 2010) cependant leurs effets sur les bactéries n'étaient pas vraiment visibles c'est pour cela que nous avons augmenté la concentration. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont à une concentration de 10mg/mL (dans un tube stérile 10mL). Une dilution sériée, dans des tubes à essais de 5mL contenant 450 μ L de protéose peptone est effectuée pour obtenir les autres concentrations de 5, 2.5 et 1.25mg/mL. Cent microlitres de la suspension bactérienne à une concentration de 10^7 UFC/mL (tube à essais de 5mL contenant 1mL

de la suspension) sont aussi déposés pour chaque dilution (pour une concentration finale 10^6 UFC/mL). Pour l'expérience avec les SPIONs, nous nous retrouvons avec 5 tubes :

- 10^6 bactéries de la souche (*S.aureus* ou *E.coli*) qui est le contrôle négatif
- 10^6 bactéries de la souche (*S.aureus* ou *E.coli*) + NPs (10, 5, 2.5, 1.25mg/mL)

3.3.3.3 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre

Dans la littérature, selon les équipes plusieurs concentrations sont étudiées (Azam, Ahmed, Oves, Khan, Habib, et al., 2012; Bagchi et al., 2012; Ren et al., 2009; Ruparelia et al., 2008). Des études préliminaires ont été effectuées pour arriver à cette concentration. La concentration minimale a été déterminée. Les nanoparticules de Cu et CuO sont à une concentration de 5mg/mL (dans un tube stérile 10mL). Une dilution sériée, dans des tubes à essais de 5mL contenant 450 μ L de protéose peptone est effectuée pour obtenir les autres concentrations de 5, 2.5 et 1.25, 0.75, 0.325 et 0.1275mg/mL. Cent microlitres de la suspension bactérienne à une concentration de 10^7 UFC/mL (tube à essais de 5mL contenant 1mL de la suspension) sont aussi déposés pour chaque dilution (pour une concentration finale 10^6 UFC/mL). Chaque dilution est incubée pendant 24 h à 37°C. Après l'incubation, le tube qui ne semble pas présenter de croissance bactérienne (CMI) est utilisé. Cent microlitres de ce tube sontensemencés afin de déterminer si les NPs s'il y a croissance ou non. Pour les futures expériences, nous avons étudié l'effet antimicrobien des NPs et Cu et CuO à une concentration de 0.325mg/mL. Pour l'expérience avec le Cu et CuO nous nous retrouvons avec 3 tubes :

- 10^6 bactéries de la souche (*S.aureus* ou *E.coli*) qui est le contrôle négatif
- 10^6 bactéries de la souche (*S.aureus* ou *E.coli*) + 0.325mg/mL de NPs de Cu
- 10^6 bactéries de la souche (*S.aureus* ou *E.coli*) + 0.325mg/mL de NPs de CuO

3.3.4 Compte viable

Lorsque toutes les suspensions sont prêtes, pour l'expérience des NPs Cu et CuO un ensemencement de géloses (TSA) est effectué au temps 0. Cent microlitres de chaque tube au T0 sont prélevés etensemencés sur gélose TSA après dilutions pour obtenir nombre de colonies compris entre 30 et 300 pour permettre le comptage. Une fois les dilutions faites, 100 μ L de la dilution voulue sont prélevés et sontensemencés sur une gélose TSA pour les NPs de Cu et CuO.

Pour chaque dilution, l'ensemencement a été effectué en triplicata. Les géloses sont ensuite incubées pendant 24 h à 37°C (temps 0, T0).

Les autres suspensions sont incubées à 37°C pendant les différents temps d'incubation (1 h, 2 h et 3 h pour les NPS Cu et CuO). Pour les SPIONs il n'y a pas d'ensemencement de géloses au temps seulement pour les temps 1 h, 3 h et 24 h. Après chaque temps d'incubation, les étapes sont refaites (prélèvement et ensemencement sur géloses). Lorsque les géloses sont ensemencées, elles sont incubées pendant 24 h à 37°C. Les colonies de bactéries formées sur chaque gélose sont ensuite comptées et le nombre de UFC (unité formant colonie) par millilitre restant dans chaque tube est déterminé (et ainsi déterminer la toxicité des NPs). Pour chaque expérience, les géloses sont faites en triplicata. Pour chaque particule étudiée, les expériences ont été faites trois fois.

3.3.5 Formation de biofilm

Pour les NPs de Cu et de CuO, des tests de toxicité ont été effectués sur le biofilm de la souche de *S.aureus* clinique (d'un patient atteint de sinusite chronique) (Bendouah et al., 2006). Les premières étapes de l'expérience sont exactement les mêmes que pour celles avec des bactéries planctoniques. Après les passages à la centrifugeuse et les lavages, les bactéries sont suspendues dans 10mL de TSB contenant 5% de glucose pour arriver à une suspension dont la D.O est de 0.75A. Il faut ramener cette solution à 0.15A. D'après des études précédentes (Bendouah et al., 2006), cette souche aurait une formation optimale de biofilm à cette D.O. Cent microlitres de la suspension de bactéries sont ensuite mis dans chaque puits d'une plaque à 96 puits (pour chaque concentration étudiée de NPs et le contrôle, les expériences sont faites en huit exemplaires). La plaque à 96 puits est incubée à 37°C pendant 24 h. Le biofilm est formé après ce temps d'incubation. Il est possible de faire une coloration au cristal violet pendant 15 minutes. Quelques lavages sont effectués (avec de l'eau), et il est possible de voir le biofilm bien coloré (Figure 3.5) (Bendouah et al., 2006).

La phase de coloration n'est pas nécessaire pour les expériences avec les NPs. Après formation de biofilm, chaque puits est lavé deux fois avec du PBS, pH 7.2. Les concentrations de NPs étudiées sont 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875mg/mL (Figure 3.6), basées sur l'étude faite précédemment avec des antibiotiques (Bendouah et al., 2006). Une dilution sériée est effectuée

(1 :2). Cent microlitres, de la concentration la plus élevée, sont déposés sur les puits suivants contenant le biofilm et 100µL de TSB. Pour chaque concentration de NPs, huit exemplaires ont été effectués. La plaque est encore incubée à 37°C pendant 24 h. Après ce temps, la plaque est lavée avec du PBS pH 7.2, jusqu'à ce que les NPs ne soient plus présents. À l'œil nu, il est possible de voir la destruction du biofilm (et ainsi, déterminer la concentration minimale de NPs permettant la mort des bactéries en biofilm).

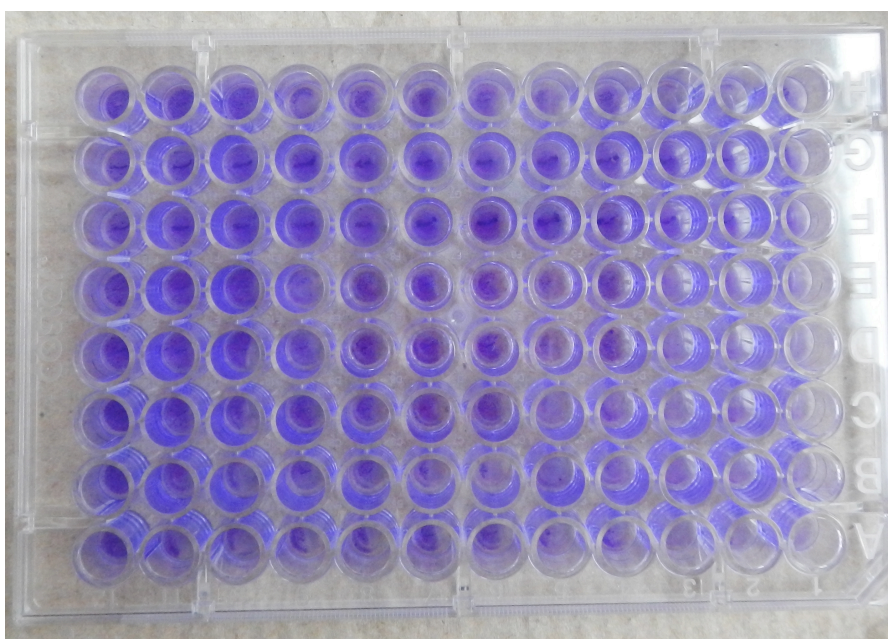


Figure 3.5: Photo représentant la formation de biofilm de *S.aureus*

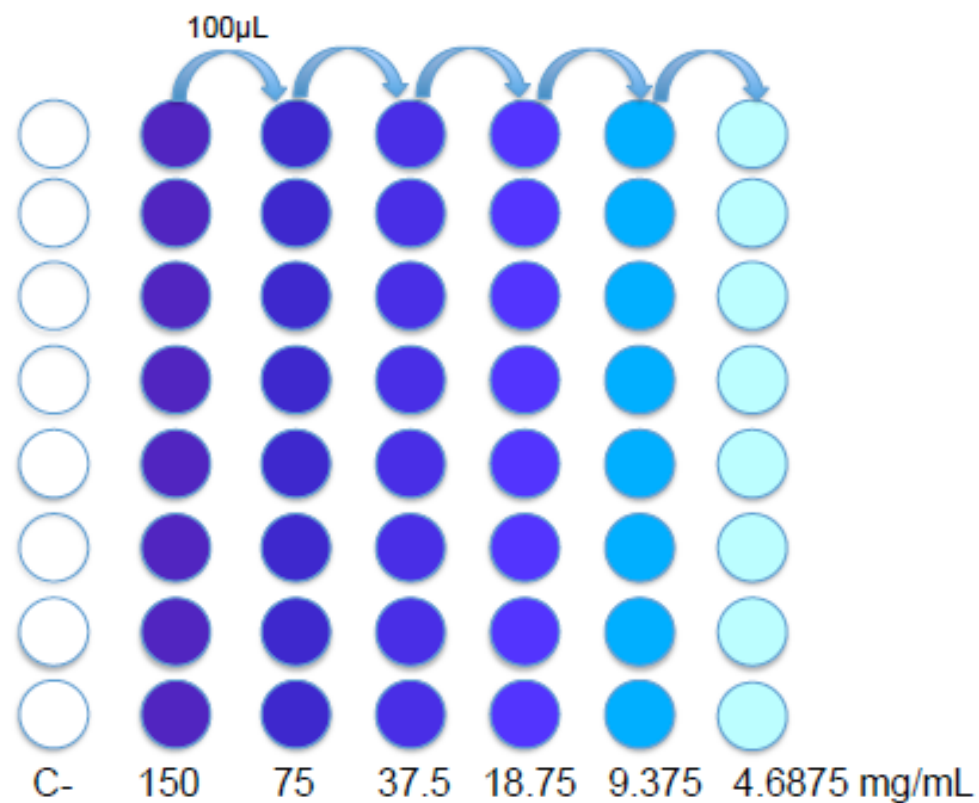


Figure 3.6: Schéma représentant l'effet de différentes concentrations des NPs de Cu et CuO (150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875mg/mL) sur un biofilm de *S.aureus*. C- contrôle négatif biofilm *S.aureus* en milieu bactérien (TSB).

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Caractérisation des nanoparticules

4.1.1 Microparticules de cuivre

Les microparticules de cuivre sont une poudre orange. Leur taille moyenne est de $21.31 \pm 7.75\mu\text{m}$. La microparticule la plus petite est de $6.205\mu\text{m}$ et la taille la plus grande est de $39.7\mu\text{m}$ (Figure 4.2). Les particules ont une forme sphérique (Figure 4.1).

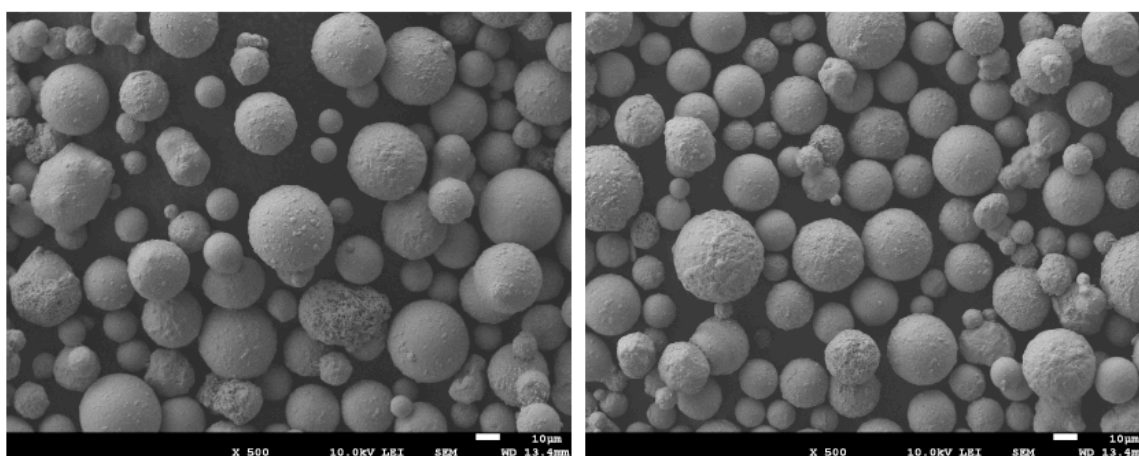


Figure 4.1: Morphologie des microparticules de Cu par SEM (x500)

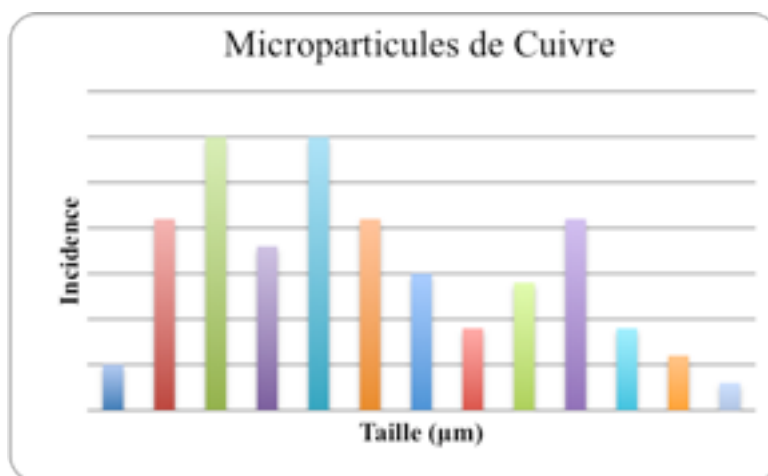


Figure 4.2: Histogrammes indiquant les distributions de la taille des microparticules de Cu

4.1.2 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre

Les nanoparticules de Cu ont été analysées par TEM où ces derniers ont montré une morphologie sphérique (Figure 4.3a). Les nanoparticules sont intégrées par un cœur de nanoparticules de cuivre couvert d'une fine couche de grains de nanoparticules formant une coquille autour de ces dernières. EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) a été utilisé dans le but de déterminer la composition des cœurs et des coquilles. Le cœur démontre une présence faible d'oxygène (EDS, Figure 4.3a) alors que le ED 2, EDS3, EDS4 (information supplémentaire) présentent une petite augmentation en oxygène. SAED (Selected Area Electronic Diffraction) a été utilisé pour déterminer la structure cristalline des nanoparticules. Cette méthode permet qui a permis de déterminer trois plans cristallins pour CuO (C2/c). Dans cette méthode, il est possible d'utiliser le mode « plusieurs cristaux à la fois » pour examiner l'orientation cristallographique entre eux. Pour les NPs de Cu, plusieurs plans cristallins ont été reportés dont trois correspondants au CuO. Cela signifie que les nanoparticules correspondent au Cu avec une oxydation partielle à la surface. La taille moyenne des cœurs est de 84.8 ± 24.6 nm et pour la coquille, une moyenne de 17.1 ± 5.0 nm (Figure 4.4a et 4.4b).

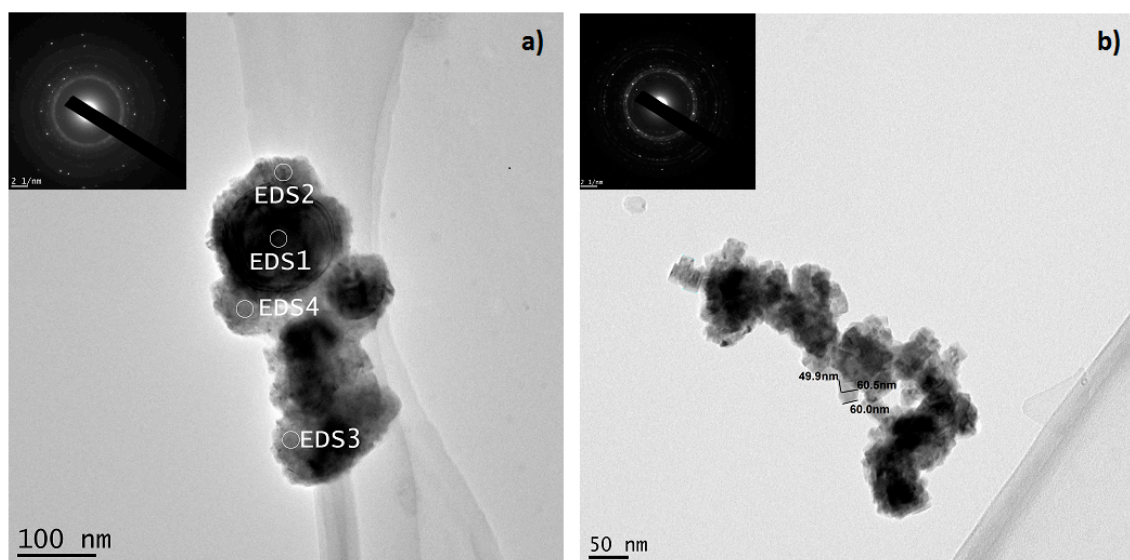


Figure 4.3: Images TEM de a) nanoparticules de Cu et b) nanoparticules CuO

Les nanoparticules de CuO montrent une forme plutôt cubique (Figure 4.3b) avec une taille moyenne de 36.5 ± 16.6 nm. L'histogramme (Figure 4.4c) montre que les tailles les plus fréquentes sont de 20nm et 50nm. Le SAED permet de voir que les nanoparticules correspondent à un système monoclinique cristallin du CuO (C2/c). Cela suggère que les plans de quelques cristaux correspondent au Cu. L'EDS démontre la présence de Cu et O. confirmant la présence de ces deux éléments.

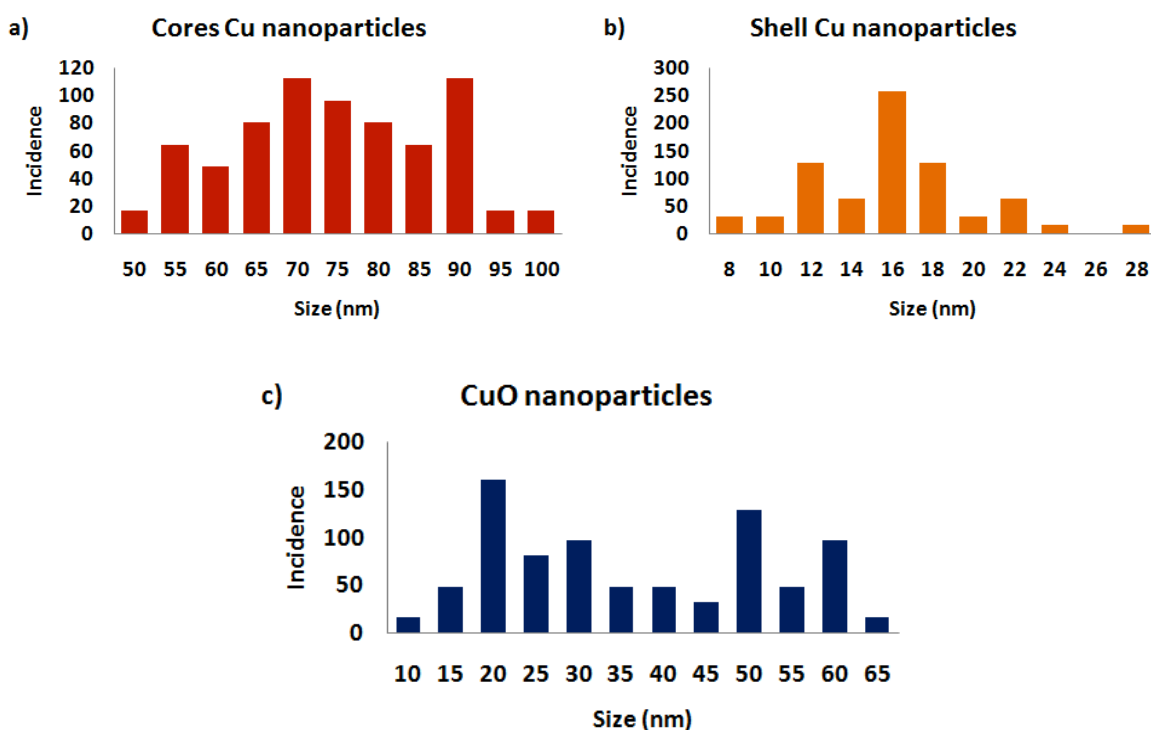


Figure 4.4: Histogrammes indiquant les distributions de la taille de a) cœur des nanoparticules de Cu b) de la coquille des nanoparticules de Cu et c) les nanoparticules de CuO

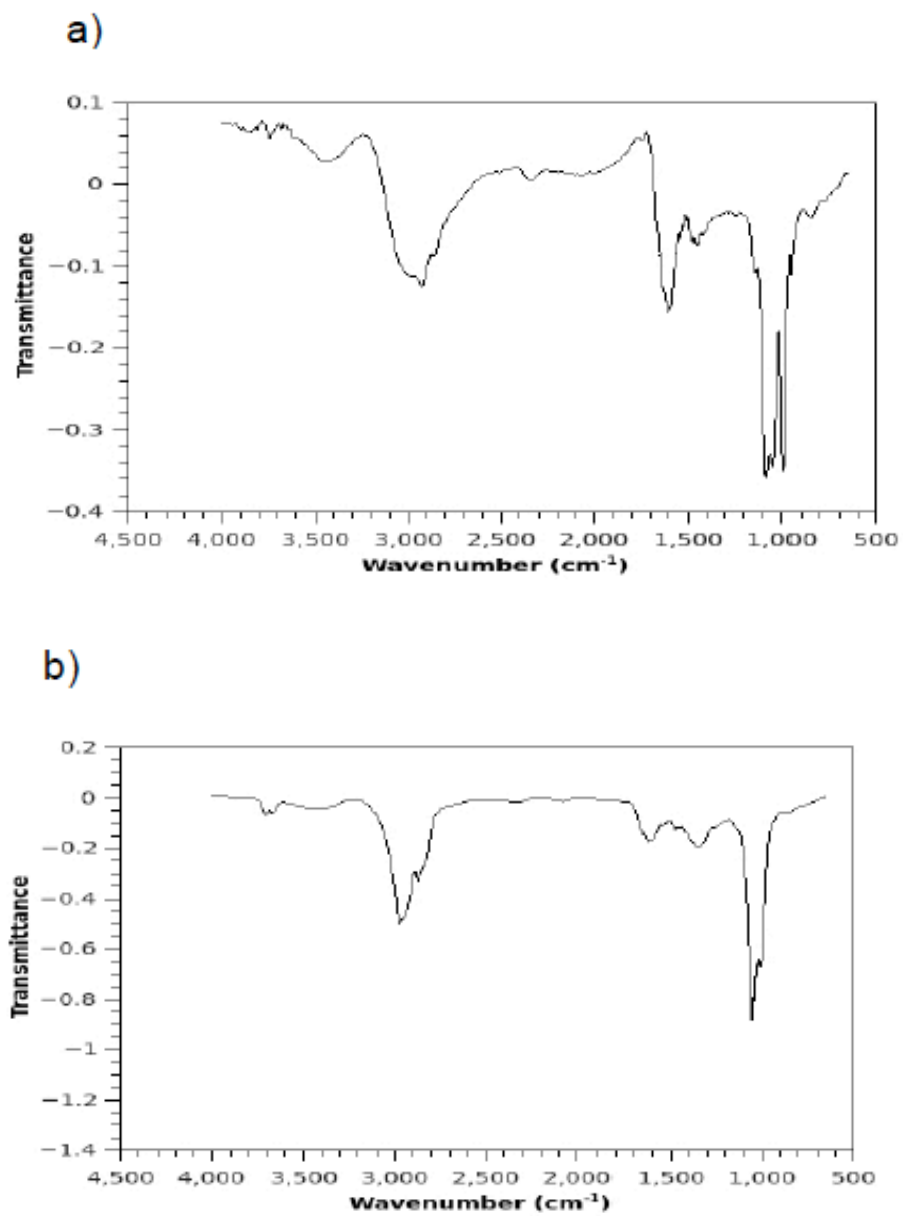


Figure 4.5: Spectres FTIR des NPs de a) cuivre et b) oxyde de cuivre immergées dans le milieu de culture bactérienne

La figure 4.5 montre un spectre FTIR des nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre. La bande à 760 cm^{-1} peut être attribuée aux liens Cu-O. La similarité entre les deux spectres FTIR (Cu et CuO) est due à une oxydation partielle des atomes de Cu dans les NPs de Cu. Deux autres bandes sont visibles à 1650 cm^{-1} et 1540 cm^{-1} qui correspondent aux vibrations des amides I et amides II respectivement. Ces bandes ne sont pas présentes dans le spectre FTIR des NPs de Cu et CuO avant immersion dans le milieu de culture bactérienne. Ils indiquent la présence des protéines à la surface des NPs de Cu et CuO après immersion dans le milieu bactérien.

Remarque : Les mesures XRD (Figure 4.6) confirment la formation des deux types d'oxyde de cuivre – cuprite ou oxyde cupreux (Cu_2O) et ténorite ou oxyde cuprique (CuO) – aussi bien sur les NPs d'oxyde de cuivre que sur les NPs de cuivre supposé pur. La figure 4.6 montre la composition des nanoparticules de Cu et CuO. La quantité de CuO est plus importante que celle du Cu_2O aussi bien pour les NPs de Cu que de CuO. La présence de Cu_2O et CuO dans les NPs de Cu indiquent une oxydation partielle de ces dernières.

Cu

No.	Visib.	Ref. Co.	Score	Compound Name	Chemical Formula
1	<input checked="" type="checkbox"/>	04-0787	60	Aluminum, syn [NFI]	Al
	<input checked="" type="checkbox"/>	04-0836	74	Copper, syn	Cu
	<input checked="" type="checkbox"/>	05-0667	61	Cuprite, syn	Cu_2O
	<input checked="" type="checkbox"/>	45-0937	78	Tenonite, syn	CuO

CuO

No.	Visib.	Ref. Co.	Score	Compound Name	Chemical Formula
1	<input checked="" type="checkbox"/>	04-0787	63	Aluminum, syn [NFI]	Al
	<input checked="" type="checkbox"/>	04-0836	63	Copper, syn	Cu
	<input checked="" type="checkbox"/>	05-0667	80	Cuprite, syn	Cu_2O
	<input checked="" type="checkbox"/>	45-0937	91	Tenonite, syn	CuO

Figure 4.6: Données XRD des nanoparticules de Cu et CuO

4.1.3 Nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont elles aussi fait l'objet d'une étude poussée de leur surface. Au laboratoire, une collègue, Karina Mireles, a déterminé la taille des nanoparticules, utilisées dans le cadre de ce projet (des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques « nues » (bare), à 9.7 ± 1.8 nm (Figure 4.7). L'étude a aussi permis de s'assurer de la composition des SPIONs à l'aide de FTIR. Les nanoparticules étaient bien composées de Fe_3O_4 . Cependant, certains contaminants à la surface étaient visibles comme le carbone oxydé ou du nitrate (NO_3). Les propriétés magnétiques ont aussi été étudiées. Les nanoparticules ont un magnétisme élevé (le magnétisme de saturation est de 27 emu/g) d'où leur appellation "superparamagnétique".

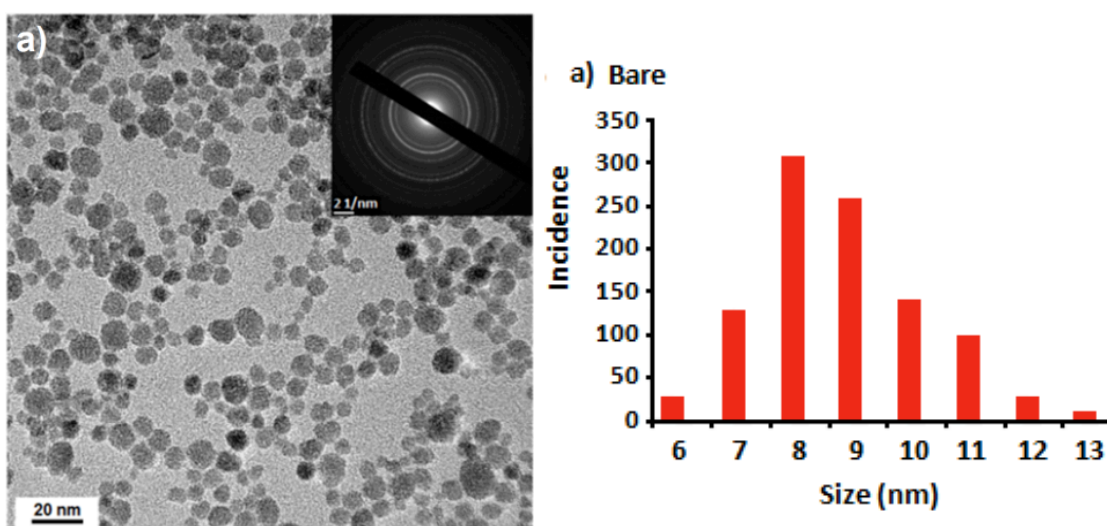


Figure 4.7: Images TEM et histogrammes indiquant les distributions des SPIONs

4.1.4 Nanoparticules d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote : tests préliminaires

4.1.4.1 FTIR

Les bandes de 740 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} and 1558 cm^{-1} correspondent aux vibrations des liens -S-N=, -CH₂-S- and -N=O, respectivement (Figure 4.8). Une étude récente sur les SPIONS fonctionnalisées aux S-nitrosothiols montre des résultats similaires (Zhang et al., 2012).

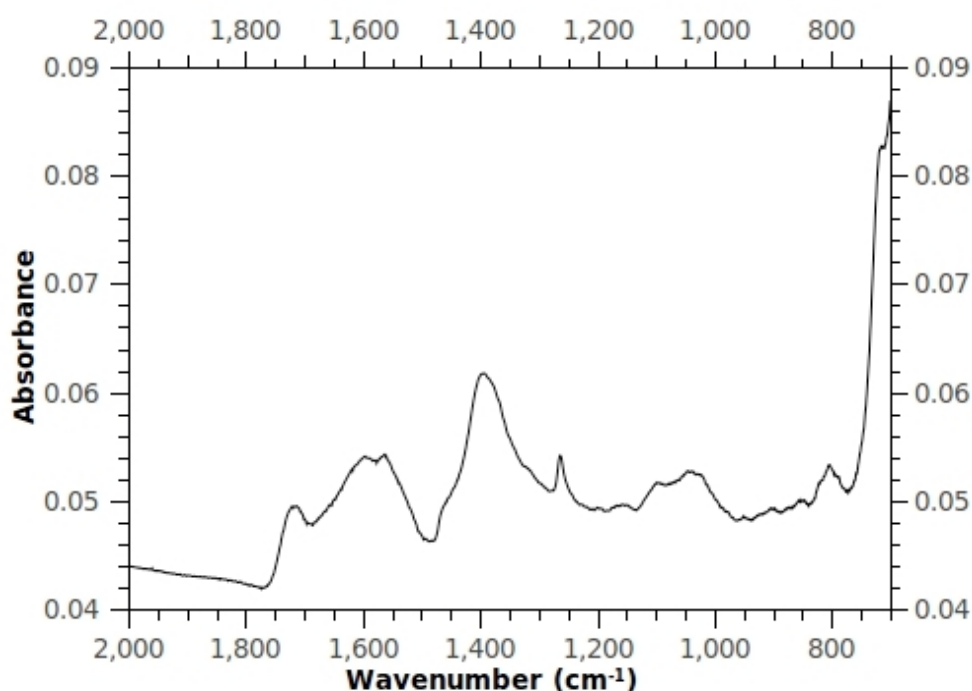


Figure 4.8: spectre FTIR SPIONs+NO

4.1.4.2 Mesure du NO

La courbe obtenue par Apollo ne permet pas de voir une libération de NO. Les bandes qui sont observables sont des artefacts dus à l'ajout du sondeur (Figure 4.9). Il ne semble pas y avoir de NO à la surface. Il semble y avoir eu un problème au niveau de l'attachement.

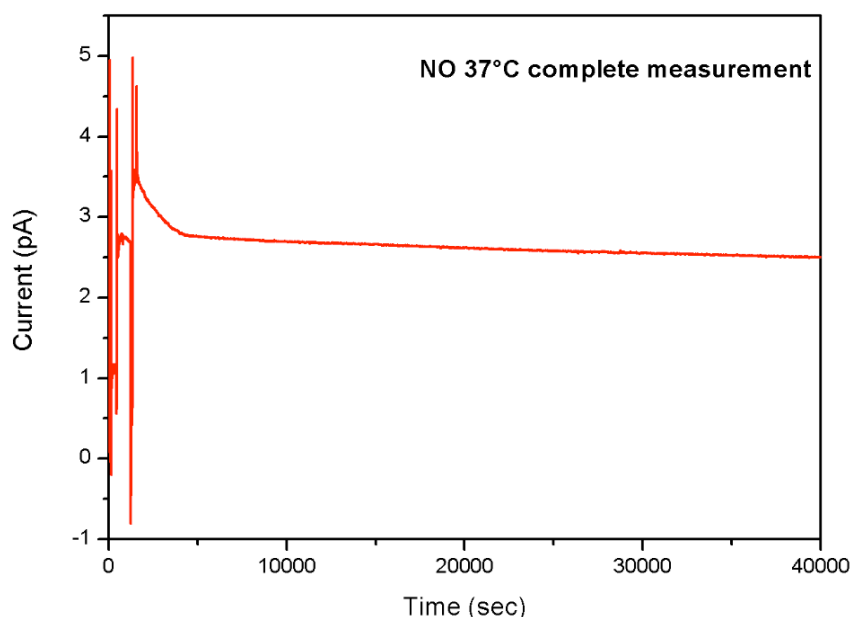


Figure 4.9: Courbe de libération de NO

4.2 Tests microbiologiques

4.2.1 Microparticules de cuivre

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par des microparticules (MPs) a été faite (trois expériences, en triplicata). Les résultats des expériences ont montré que la CMI pour *S.aureus* des MPs était de 3mg/mL. Tandis que pour *E.coli*, la CMI était de 6mg/mL. Les MPs auraient un effet toxique sur *E.coli* (Figure 4.11) plus important que sur *S.aureus* mais a des concentrations plus élevées (Figure 4.10). Au temps 0, 1 h, 2 h il n'y a pas d'effet des MPs sur la croissance bactérienne de *S.aureus*. Après 3 h, il a été observé une diminution de moitié de la croissance de *S.aureus* (Figure 4.10) à une concentration de 3mg/mL.

Pour *E.coli*, après une heure de contact aux MPs, la croissance diminue de 3 fois comparée au contrôle positif. Après 2 h de contact des MPs aux bactéries, l'effet commence à être plus visible (l'inhibition est de plus de 35 fois). Après 3 h de contact l'effet est encore plus

notable, la croissance est réduite de plus de 10000 fois pour une concentration de MPs de 6mg/mL (Figure 4.11)

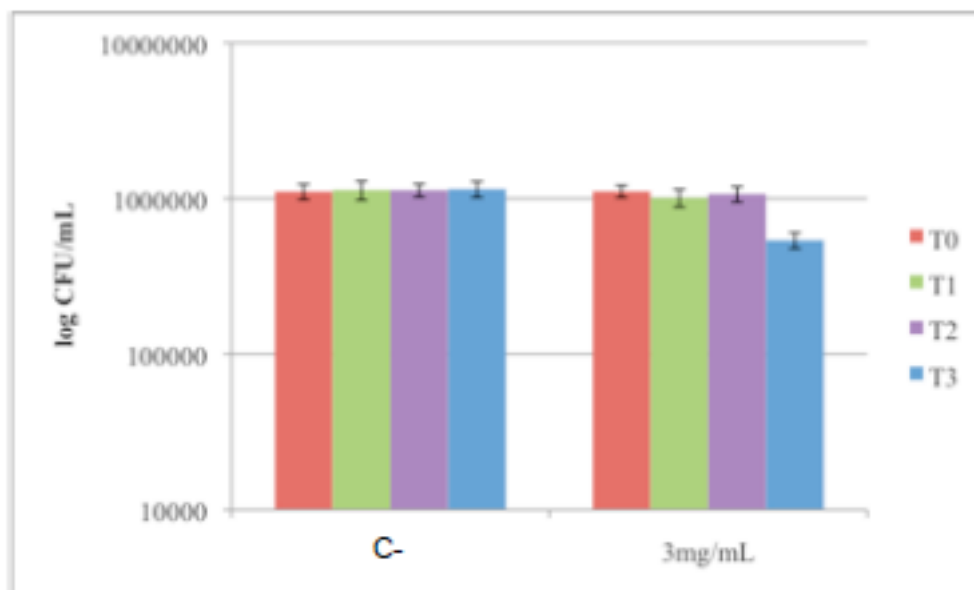


Figure 4.10 : Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration en MPs de Cu (3mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche *S. aureus*

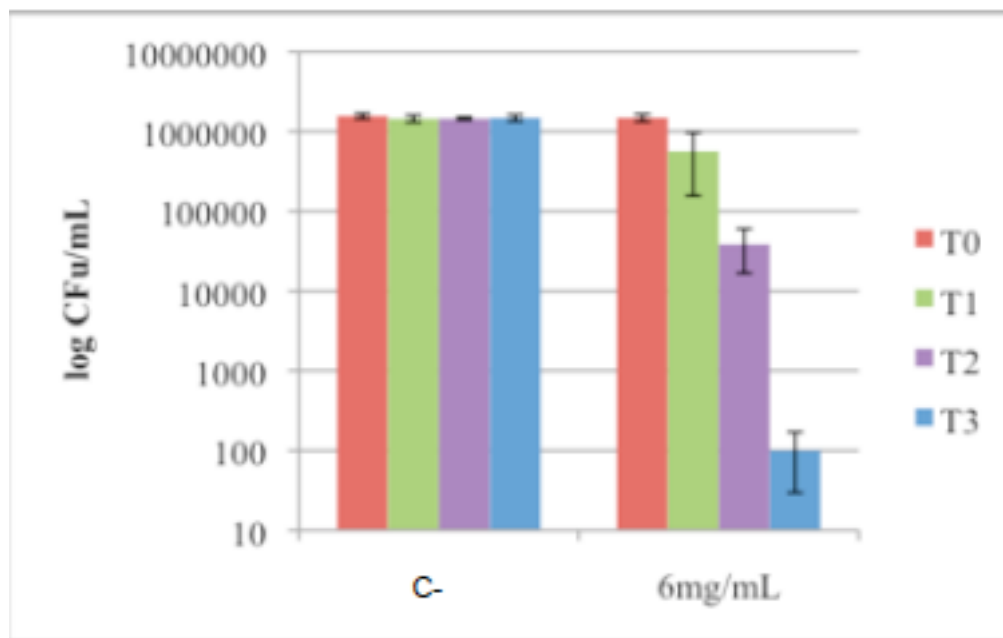


Figure 4.11: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration en MPs de Cu (6mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche *E.coli*

4.2.2 Nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre

De tests préliminaires, que nous avons effectués, ont montré que les NPs Cu et CuO avaient un effet sur les bactéries à différentes concentrations (3, 1.5, 0.75, 0.325 et 0.175mg/mL). À une concentration de 0.175mg/mL, nous observons une croissance bactérienne pour *S.aureus* et une croissance est visible pour *E.coli*. La CMI des NPs de Cu sur la souche *S.aureus* est de 0.325mg/mL et 0.750mg/mL pour la souche *E.coli*. Des prélèvements des suspensions de la CMI ont étéensemencés sur des géloses pour déterminer si l'effet des NPs était bactériostatique ou bactéricide (concentration minimale bactéricide). Il était possible d'observer des colonies (croissance bactérienne) signifiant que les NPs sont bactériostatiques pour ces deux souches bactériennes.

La CMI est de 0.325mg/mL pour les deux souches bactériennes. La même procédure a été effectuée pour déterminer si à cette concentration, les NPs étaient bactériostatiques ou bactéricides envers les souches bactériennes. Les résultats ont permis de conclure que ces NPs

étaient elles aussi bactériostatiques. Pour les expériences futures, la concentration étudiée a été fixée à 0.325mg/mL.

Nos résultats montrent qu'aussi bien les NPs de Cu et CuO ont un effet bactériostatique sur les souches *S.aureus* et *E.coli* (Figure 4.12 et 4.13). Cependant il est notable que les NPs de CuO soient plus toxiques envers *S.aureus* (622.5 et 414.1667 colonies formées avec NPs Cu après 2 h et 3 h de contact respectivement contrairement à 122.5 et 50.8333 colonies formées en présence de NPs de CuO après 2 h et 3 de contact respectivement) (Figure 4.12). Inversement, *E.coli* semble être plus susceptible aux NPs de Cu (0 colonie formée après 2 et 3 h de contact contrairement à 40 colonies formées en moyenne après 2 h de contact et 29.2 colonies formées en moyenne après 3 h en présence de NPs de CuO) (Figure 4.13).

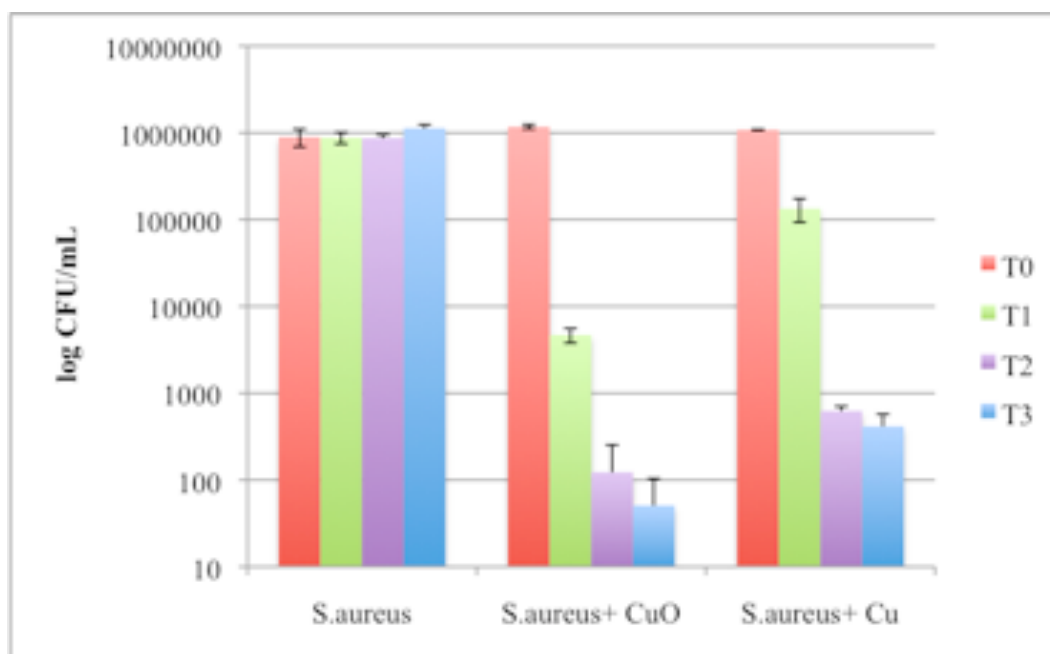


Figure 4.12: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration des NPs Cu et CuO (0.325mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche *S.aureus*

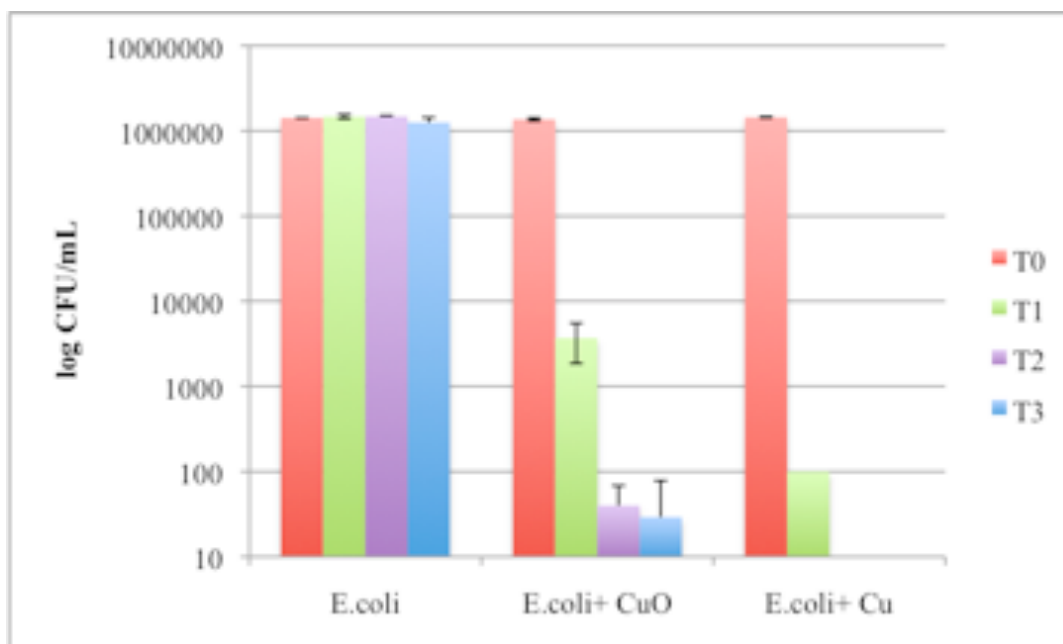


Figure 4.13: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitres en fonction de la concentration de NPs Cu et CuO (0.325mg/mL) au temps (T0), 1 h (T1), 2 h (T2) et 3 h (T3) d'incubation pour la souche *E.coli*

Lorsque les nanoparticules sont mises en contact avec le biofilm, il est nécessaire d'augmenter la concentration afin de pouvoir détruire le biofilm. Les NPs de Cu demandent une concentration minimale inhibitrice (CMI) plus faible pour tuer les bactéries (environ 4.7mg/mL). Tandis que les NPs de CuO ont besoin d'une plus grande concentration minimale inhibitrice (CMI) (150mg/mL).

4.2.3 Nanoparticules d'oxyde de fer

Avant de regarder les effets des SPIONs couplés au NO sur les bactéries, des expériences ont été effectuées, dans les mêmes conditions, pour les nanoparticules d'oxyde de fer nues. Les nanoparticules ont été mises en contact avec les bactéries 1, 3 et 24 h.

Les SPIONs ont un faible effet antibactérien sur *S.aureus* et n'ont presque pas d'effet sur *E.coli* (Figure 4.14 et 4.15).

Il est possible de remarquer aussi que l'effet toxique des NPs sur *S.aureus* est dépendant de la concentration des NPs (l'effet toxique survient à une concentration de 5mg/mL et plus) et aussi du temps de contact des NPs avec les bactéries (après 24 h, l'effet des NPs est plus visible) (Figure 4.14).

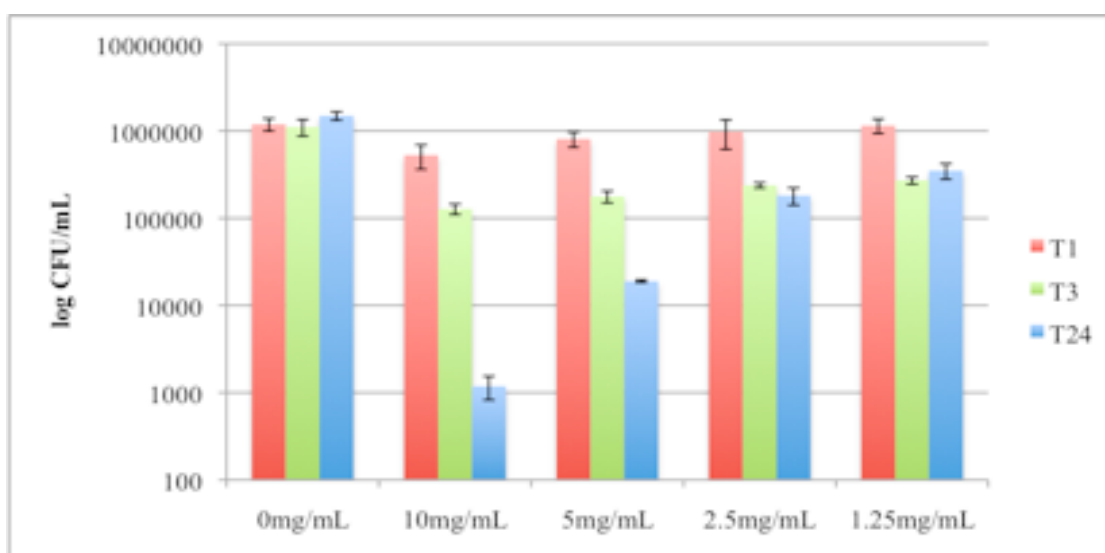


Figure 4.14: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h (T1), 3 h (T3) et 24 h (T24) d'incubation pour la souche *S.aureus*

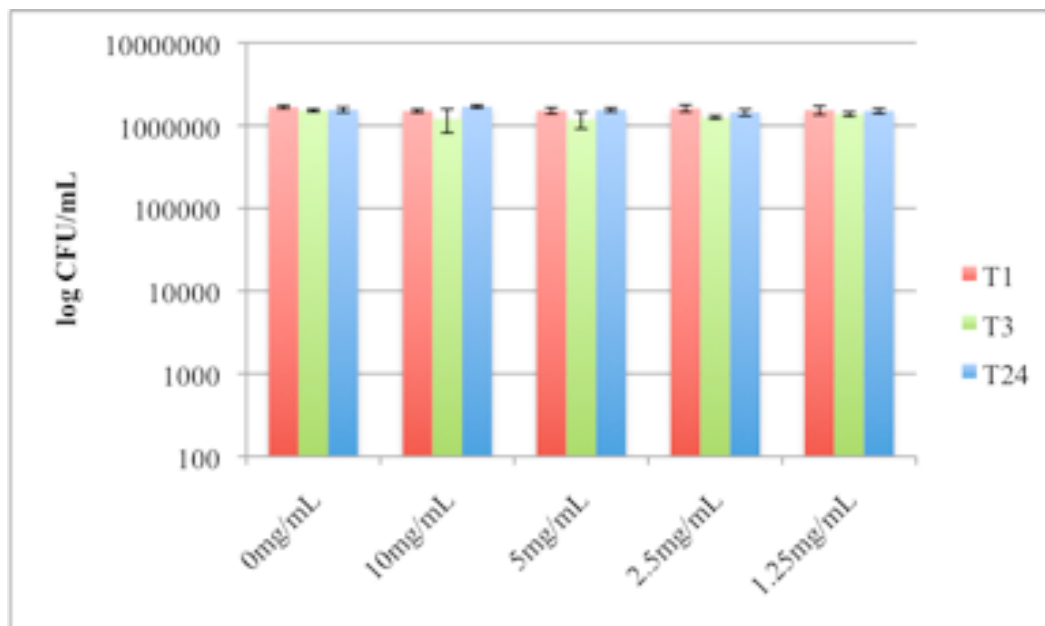


Figure 4.15: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h (T1), 3 h (T3) et 24 h (T24) d'incubation pour la souche *E.coli*

4.2.4 Nanoparticules d'oxyde de fer : tests préliminaires

Des tests préliminaires ont été effectués avec de nanoparticules d'oxyde de fer couplées au NO. Ces résultats ont plusieurs défauts, mais permettent d'avoir une légère idée de l'effet du monoxyde d'azote. La quantité de NO à la surface n'est pas connue. Nous remarquons que l'effet après 1 h de contact avec les SPIONs+NO pour les deux souches est très faible (Figure 4.16). À partir de 3 h d'incubation, une légère inhibition de la croissance est observable pour les deux souches à une concentration de 10mg/mL (Figure 4.17). Après 24 h, les NPs sembleraient avoir de l'effet sur la souche *S.aureus*, mais pas d'effets importants sur la souche *E.coli* (Figure 4.18). Cependant, ce que nous remarquons ici peut être expliqué par diverses choses autres que l'action des SPIONs+NO. Nous observons qu'entre les différents temps d'incubation le nombre de bactéries présentes dans le contrôle positif (bactéries dans milieu bactérien) n'est pas stable. C'est ainsi que nous avons changé le protocole afin d'éliminer ce paramètre.

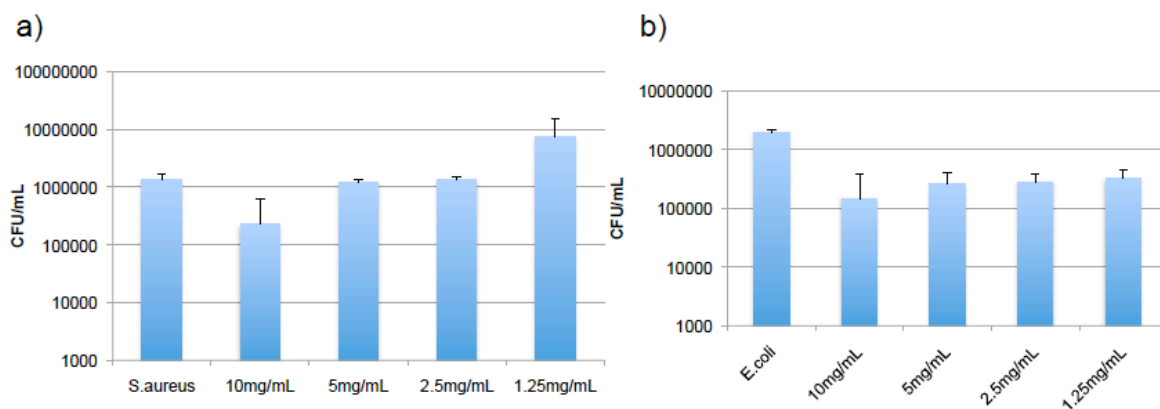


Figure 4.16: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 1 h d'incubation pour la souche a) *S. aureus* et b) *E. coli*

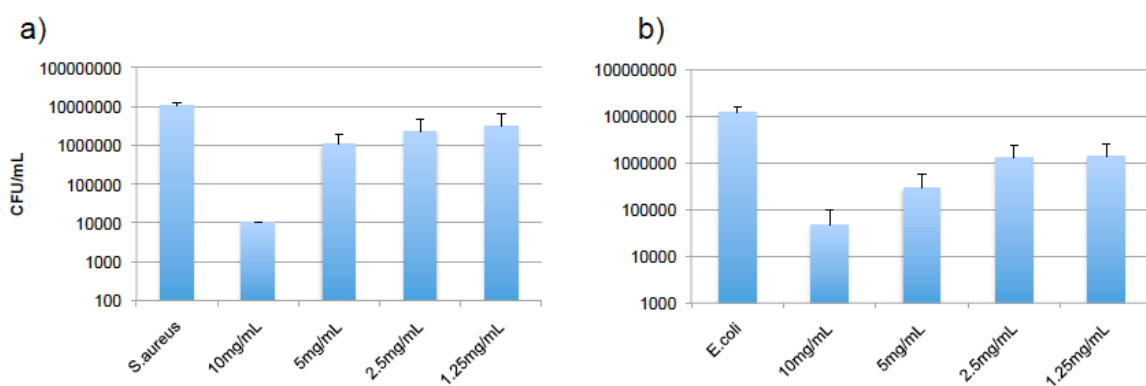


Figure 4.17: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 3 h d'incubation pour la souche a) *S. aureus* et b) *E. coli*

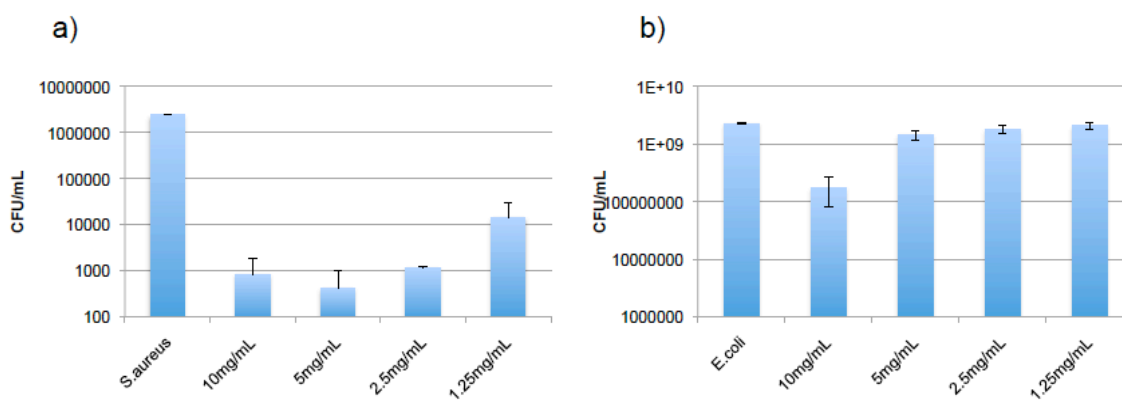


Figure 4.18: Histogrammes montrant le nombre de colonies formées par millilitre en fonction de la concentration en SPIONs après 3 h d'incubation pour la souche a) *S. aureus* et b) *E. coli*

5. DISCUSSION

5.1 Discussion des résultats

5.1.1 Particules de cuivre et d'oxyde de cuivre

5.1.1.1 Importance de la taille

Selon nos analyses de surface des particules (TEM), il est possible de voir que les NPs de Cu (forment un noyau de $84.8 \pm 24.6\text{nm}$ entouré d'une coquille de $17.1 \pm 5.0\text{nm}$) ont une taille plus grande que celles de CuO ($36.5 \pm 16.6\text{ nm}$) (Figure 4.4). Les tailles de NPs Cu sont un peu élevées comparées à celles retrouvées dans la littérature. Une équipe utilise des NPs de Cu ayant des tailles proches des nôtres Chatterjee (80nm) (Chatterjee et al., 2012). L'équipe de Chatterjee a utilisé des NPs de Cu d'une taille de 80nm. Chatterjee remarque un effet bactéricide à une concentration de $7.5\mu\text{g/mL}$ sur la souche *E.coli* (Chatterjee et al., 2012). Cette concentration est beaucoup plus faible que celle que nous avons utilisée (0.325mg/mL).

Pour les NPs de CuO, nos résultats sont semblables à ceux retrouvés dans la littérature (Annexe I). Cependant, si nous observons les concentrations que les différents chercheurs ont utilisées (Annexe I), elles diffèrent malgré la même composition des NPs. Les concentrations, pour les tailles semblables à nos résultats, peuvent aller de 2.5mg/mL (Ren et al., 2009) à $65.9\mu\text{g/mL}$ (Baek & An, 2011). Les chercheurs trouvent que les NPs de CuO ont des effets antibactériens cependant les différences de concentrations peuvent être expliquées par la taille des NPs, mais aussi par le temps d'incubation des NPs ainsi que la méthode de synthèse sans oublier la souche bactérienne étudiée.

Quant à nos microparticules de cuivre, les analyses ont montré qu'elles avaient une taille moyenne de $21.31 \pm 7.75\mu\text{m}$. Le comportement des nanomatériaux est gouverné par la taille et la composition des particules (Chen et al., 2006; Deryabin et al., 2013; Miao et al., 2012). Nous remarquons que la taille joue un rôle important dans la toxicité contre les bactéries. Lorsque nous regardons nos résultats sur les tests microbiologiques, nous remarquons que la concentration nécessaire pour réduire la croissance bactérienne est de plus de 10 fois plus élevée pour les MPs

(6mg/mL pour *E.coli* et 3mg/mL pour *S.aureus*) que pour les NPs (0.325mg/mL). En effet, cela peut s'expliquer par le fait que les nanoparticules ont un ratio surface/volume beaucoup plus élevé que les microparticules ou le cuivre libre (Hajipour et al., 2012; Morones et al., 2005) ce qui change toutes les propriétés mécaniques, chimiques, électriques (Hajipour et al., 2012; Morteza Mahmoudi & Serpooshan, 2012). Cela signifie que pour le même volume, il y a plus de nanoparticules présentes que de microparticules. Donc il y a plus de surface, dans les NPs, qui peut réagir avec les bactéries contrairement aux MPs. De nombreux rapports montrent que plus les nanoparticules sont petites plus elles ont une toxicité élevée en comparaison avec des NPs plus grosses ou des matériaux micrométriques (Jones, Ganopolsky, Labbe, Wahl, et al., 2010).

Selon le Tableau (Annexe I) nous remarquons que dans la même échelle (nanométrique) (Blinova, Ivask, Heinlaan, Mortimer, & Kahru, 2010) différentes tailles de particules sont utilisées par divers chercheurs. Les particules à l'échelle nanométrique sont très toxiques et leur taille joue un grand rôle dans la toxicité des particules (Blinova et al., 2010). Il est même possible de voir des différences au sein d'une même échelle. Une équipe a étudié deux mêmes nanoparticules (d'oxyde de cuivre) ayant des tailles différentes (20 et 28nm). Ils ont remarqué que plus la taille était petite plus ces nanoparticules étaient toxiques. Les plus petites nanoparticules avaient une zone d'inhibition de la croissance bactérienne plus grande. Ils ont observé qu'il fallait une concentration de 20µg/mL de NPs CuO pour inhiber la croissance d'*E.coli* avec la particule de 20nm alors qu'il fallait une dose de 65µg/mL pour la particule de CuO de 28nm. Le même effet est remarqué pour *S.aureus*, la particule de 20nm demandait une concentration de 25µg/mL pour inhiber la croissance tandis qu'il fallait une concentration de 75µg/mL pour la particule de 28nm (Azam, Ahmed, Oves, Khan, & Memic, 2012). De plus, les différences retrouvées entre chaque équipe peuvent être expliquées par les différentes méthodes de synthèses des nanoparticules. Chaque équipe utilise une méthode différente, ainsi les particules qu'ils possèdent ne sont pas similaires. La tendance est que la biotoxicité des NPs de cuivre augmente lorsque la taille des particules diminue de l'échelle macro vers l'échelle nano et atomique. Pour clarifier définitivement cette question encore débattue dans la littérature, nous suggérons d'identifier et de mesurer les espèces réactives d'oxygène (ERO) qui sont les mécanismes de toxicité.

5.1.1.2 Composition des particules

Les résultats FTIR montrent que les deux spectres FTIR des nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre sont très semblables. Cette similarité est peut-être le fait que les atomes de cuivre s'oxydent partiellement. Les résultats XRD viennent confirmer cette hypothèse. Les NPs de Cu ne sont pas pures et sont couvertes d'une couche d'oxydation. Les mêmes résultats ont été retrouvés lors de l'étude de la cristallinité des NPs de Cu avec la méthode SAED. L'oxydation empêche l'étude de la toxicité des NPs de cuivre pur et de leur comparaison avec des NPs de CuO. Les nanoparticules de cuivre ont d'importantes limitations, dont la rapide oxydation due à leur exposition à l'air ambiant. Le cuivre s'oxyde en CuO et en oxyde cuivreux (Cu₂O) et qui se convertit en Cu²⁺ lors de la préparation et du stockage. Donc la synthèse de NPs de Cu à l'air ambiant est très difficile. Il existe plusieurs alternatives qui ont été développées pour synthétiser les nanoparticules métalliques en présence de polymères (chitosan, polyéthylène glycol), des surfactants (ammonium bromide) comme stabilisateurs, et aussi pour former des recouvrements à la surface des nanoparticules (Shameli et al., 2012). Cependant, ces alternatives ont elles aussi des limites dans leur méthode de synthèse qui peuvent jouer dans la toxicité des nanoparticules. Le cuivre s'oxyde rapidement après exposition à l'air, ce qui peut conduire à l'aggrégation des particules et qui peut affecter les propriétés antimicrobiennes des NPs de Cu-chitosan. L'oxydation des NPs de Cu implique une réaction rapide de conversion du Cu en CuO_x ($x \sim 0.67$) avec la structure du Cu₂O et c'est suivi par une oxydation lente et continue avec x changeant de 0.67 à environ 1 quand la température augmente de 298 à 673K. Dans cette étude, les NPs ont été gardées à température ambiante, la phase d'oxydation observée, était largement du Cu₂O avec aucun changement de l'état d'oxydation ou de l'épaisseur de la couche après un jour. Même après 17 jours, la couche d'oxydation reste dans les environs de 3.6nm d'épaisseur. Le taux d'oxydation est suffisamment faible pour tous les changements visibles de la couche d'épaisseur après 17 jours, mais cette couche peut augmenter après des mois ou des années. Des études précédentes ont montré que la surface d'oxydation des métaux éventuellement s'arrête de croître lorsque la couche atteint une épaisseur critique à une faible température (13nm à température pièce) (Cabrera & Mott, 1949; Kanninen, Johans, Merta, & Kontturi, 2008). L'oxygène est d'abord absorbé à la surface des nanoparticules métalliques et est converti en ions, créant une différence potentielle entre le métal et l'oxygène absorbé. Les ions métalliques sont alors attirés à la surface pour former des liens avec l'oxygène, induisant une croissance de la couche d'oxyde.

Le potentiel électrostatique est indépendant de l'épaisseur de la couche d'oxyde (Cabrera & Mott, 1949). La croissance lente de la couche d'oxyde de cuivre après une année a été observée. Le champ électrostatique entre l'oxygène et le métal est proportionnel au potentiel et inversement proportionnel à l'épaisseur de l'oxyde. Donc, quand moins d'oxygène est absorbé et/ou la couche d'oxyde s'épaissit, le champ ne sera pas assez fort pour attirer les ions métalliques et la croissance de l'oxyde va ralentir ou même arrêter. Nous avons noté de notre étude que l'oxydation des nanoparticules de cuivre se produisait rapidement à l'air ambiant et forme une couche d'oxyde qui peut protéger les nanoparticules d'une oxydation ultérieure à la même température. Lorsque la couche d'oxyde se forme, la capacité de générer des ERO pour les nanoparticules de cuivre est réduite ainsi l'oxydation module la production de ERO (par conséquent la toxicité des NPs de cuivre) (Miao et al., 2012). L'équipe de Midander a démontré que des ions de Cu pouvaient être libérés par les NPs de CuO, et la quantité soluble varie selon les différents milieux. Les études de cytotoxicité ont montré que les NPs de CuO exerçaient des effets toxiques, et la libération des ions de Cu par les NPs de CuO ne jouaient qu'un petit rôle dans la toxicité (Midander et al., 2009). Quand le temps d'exposition était augmenté, les ions de Cu^{2+} libérés des NPs de CuO causaient des dommages significatifs sur l'ADN, et étaient la cause de 31% des dommages de la membrane (Z. Wang et al., 2012). Aussi bien les NPs d'oxydes métalliques et les ions contribuent à la cytotoxicité, quand les cellules sont exposées aux NPs d'oxydes métalliques. Lors de notre étude, nous avons remarqué que les deux NPs (Cu et CuO) avaient une couche d'oxydation. Les NPs de Cu ont cependant une couche plus faible. Nous avons vu que les NPs de Cu et CuO n'ont pas le même effet sur les bactéries, et cette oxydation peut jouer un rôle. Cependant, les deux types de nanoparticules ont un très bon effet antimicrobien. La composition joue un rôle, mais aussi le type de souche bactérienne.

Les NPs ne constituent pas des systèmes thermodynamiquement stables. On peut définir une tension interfaciale qui donne à cet état dispersé une grande énergie libre de Gibbs. Il est donc presque impossible d'éviter la contamination des NPs durant la synthèse dans l'air ou milieu aqueux. En plus de l'oxydation au contact de l'air, le phénomène de « couronne » protéinique ou de contaminants modifie la nature chimique des surfaces des NPs, donc leur toxicité (Mahmoudi, Yahia et al. Springer, 2013). Les techniques de recouvrement des NPs par des polymères modifient également la chimie des surfaces, et par conséquent leur toxicité ou les ERO produites.

5.1.1.3 Type de souche bactérienne

Nos résultats sur les NPs montrent que dépendamment de la composition de la nanoparticule, elle n'agit pas de la même manière sur les deux souches bactériennes. Nous remarquons que les NPs de CuO sont plus efficaces contre la souche *S.aureus* contrairement à la souche *E.coli* qui serait plus susceptible aux NPs de Cu selon nos résultats (Figure 4.12 et 4.13). Ces résultats se comparent à ceux de la littérature qui montrent que la toxicité des NPs peut varier significativement entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et dans certains cas varient même entre les organismes (Jiang, 2009). L'équipe de Ren a regardé les mêmes nanoparticules de Cu et de CuO sur différentes souches bactériennes. Les concentrations nécessaires pour avoir un effet antibactérien diffèrent tellement dépendamment de la souche bactérienne (Ren et al., 2009), ce qui vient confirmer nos résultats. Ce phénomène peut être expliqué par les différentes membranes cellulaires qui permettent ou non plus facilement l'accès aux NPs (Baek & An, 2011). Nous avons vu précédemment que les membranes cellulaires sont des structures très complexes composées de différentes molécules, protéines, et lipides. Les NPs interagissent avec les protéines (Chatterjee et al., 2012) de la membrane bactérienne causant des dommages (Azam, Ahmed, Oves, Khan, Habib, et al., 2012; Theivasanthi & Alagar, 2011). Cependant les mécanismes de dommages ne sont pas bien élucidés (J. Fang, Lyon, Wiesner, Dong, & Alvarez, 2007). Des études ont remarqué que les NPs s'attachent à la surface des bactéries de différentes manières soit par des forces Van der Waals, soit électrostatiques, hydrophobiques ou des interactions récepteurs ligands (McWhirter, McQuillan, & Bremer, 2002; Parikh & Chorover, 2006). Les molécules qui sont le plus susceptibles d'interagir avec les bactéries (Gram positive ou négative) sont les LPS. Les LTA, les protéines et phospholipides (Jiang, Yang, Vachet, & Xing, 2010). Une fois à l'intérieur de la bactérie après perturbation de la membrane cellulaire, les nanoparticules de CuO vont libérer les espèces réactives d'oxygène (ERO). La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est plus exposée aux NPs, car elle est fine et permet d'avoir accès à la membrane bactérienne externe.

Nous avons aussi étudié les NPs de Cu et de CuO sur un biofilm de la souche *S.aureus* (souche clinique). L'effet de ces NPs sur les bactéries planctoniques et en forme de biofilm diffère. Il faut une concentration beaucoup plus élevée pour avoir une inhibition de la croissance des bactéries en biofilms. La concentration de NPs de Cu est plus de 10 fois élevée pour inhiber la croissance des biofilms que les bactéries planctoniques de *S.aureus* (concentration d'environ

4.7mg/mL pour des biofilms et 0.325mg/mL pour bactéries planctoniques pour les NPs de Cu) tandis que les NPs de CuO ont besoin de plus de 400 fois la concentration de bactéries planctoniques (150mg/mL pour les NPs de CuO en biofilm et 0.325mg/mL pour les bactéries planctoniques). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature et démontrent que les bactéries en biofilm sont beaucoup plus dures à tuer, et les NPs ont beaucoup de difficultés à pénétrer. Des études ont été effectuées avec des antibiotiques, et les biofilms demandaient 1000 fois la concentration d'antibiotiques nécessaires pour les bactéries planctoniques (Bendouah et al., 2006). Cependant, nous avons remarqué lors des lavages du biofilm après contact aux NPs, que les NPs étaient bien pénétrées dans le biofilm. Nos résultats suggèrent que les NPs de Cu sont plus susceptibles de détruire un biofilm de *S.aureus*. Tandis que nos résultats sur les bactéries planctoniques de *S.aureus* ont montré que ces dernières étaient plus sensibles à l'effet des NPs de CuO. Les NPs ne doivent pas avoir les mêmes mécanismes d'effets antimicrobiens que pour les bactéries planctoniques. Les bactéries en biofilm se rassemblent afin de réduire la surface exposée aux agents antimicrobiens (H. H. P. Fang, Xua, & Chan, 2002) ainsi les NPs ont moins la possibilité d'agir. Le changement physiologique (Jiang et al., 2010) des bactéries individuelles dans les biofilms augmenterait leur résistance aux agents antimicrobiens ; ce qui pourrait expliquer aussi pourquoi il est nécessaire d'augmenter les doses de NPs contrairement aux bactéries planctoniques (Mah & O'Toole, 2001). Une autre raison est l'hétérogénéité retrouvée dans le biofilm. La composition chimique (concentration des métabolites, pH) du biofilm (Jiang et al., 2010) peut avoir un rôle sur la capacité des NPs à pénétrer et avoir un effet bactéricide. Le biofilm contient des bactéries à différents stades de croissance avec des niveaux d'activités différents (Stewart, 2003) de plus les bactéries en biofilm ont une diversité génétique importante (Jiang et al., 2010).

Les nanoparticules de cuivre et d'oxyde de cuivre sont des candidats très prometteurs pour leur utilisation contre les bactéries. Ils sont très efficaces à de faibles concentrations et agissent de façon rapide. Cependant, malgré le fait que le cuivre soit un élément essentiel au corps humain, à une certaine dose (1.5 à 3 mg/kg/jour) il deviendrait toxique pour les cellules humaines. Actuellement les doses utilisées par les chercheurs afin de tuer les bactéries sont trop élevées pour que ces NPs de cuivre ou oxyde de cuivre soient utilisées dans le domaine biomédical et, car elles sont considérées comme non biocompatibles lorsque la dose dépasse celle tolérée par l'homme (Chen et al., 2006). Un excès de cuivre dans le corps humain mène à la

génération de radicaux endommageant, comme l'hydroxyle (Gaggeli, 1995 ; (Chen et al., 2006; Miao et al., 2012) cela peut même mener à une cirrhose hépatique (Chen et al., 2006). Les nanoparticules de cuivre et oxyde de cuivre sont un très bon candidat pour des utilisations où il n'y a pas d'interactions avec des cellules humaines comme dans la tuyauterie, canalisations, les aérations dans les hôpitaux ou autres. Il est nécessaire donc de trouver un candidat biocompatible qui servirait d'antibactérien sur des implants médicaux. Notre alternative est l'utilisation des SPIONs chargées avec du NO.

5.1.2 Nanoparticules d'oxyde de fer

5.1.2.1 Caractérisations physico-chimiques

Leurs propriétés magnétiques sont excellentes et cela est dû à leur petite taille (9.7 ± 1.8 nm). En effet, il y a une corrélation entre la taille de la particule et ses propriétés. Plus la particule est petite et plus son moment magnétique sera élevé (Durmus et al., 2013). La composition chimique est le facteur de base associé aux propriétés antibactériennes. Plusieurs chercheurs sont dévoués à un type d'élément chimique ou à ce même élément modifié avec d'autres composants (Jia, Hou, Wei, Xu, & Liu, 2008).

5.1.2.2 Tests microbiologiques

Les SPIONs sont connus pour avoir des effets toxiques très faibles. Les études in vitro sur les nanoparticules d'oxyde de fer ont démontré qu'effectivement ces NPs étaient très peu ou non toxiques comme matériel. Les résultats obtenus avec ce matériel viennent valider ce qui a déjà été retrouvé dans la littérature (Molina, Seabra, de Oliveira, Itri, & Haddad, 2013). L'effet est notable pour la souche *S.aureus* seulement après 24 h d'incubation à de hautes concentrations de NPs (10 et 5mg/mL) (Figure 4.14). Cependant, l'effet est très faible pour les concentrations plus faibles (2.5, 1.25mg/mL) après 24 h (Figure 4.14). Pour les autres temps de contact, l'effet des SPIONs est faible. Quant à la souche d'*E.coli*, les SPIONs ne semblent pas avoir d'effet (Figure 4.15). Des études ont montré que les nanoparticules d'oxyde de fer avaient un effet antibactérien

plus évident sur les bactéries à Gram positif contrairement aux bactéries à Gram négatif, comme nous observons dans nos résultats (Behera & Shekhar, 2012) malgré que l'effet soit très faible.

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont connues pour être biocompatibles (Mbeh et al., 2012) et ont peu d'effets antibactériens que nous avons confirmés par cette hypothèse. Très peu de recherches sont effectuées sur les SPIONs seules, car plusieurs recherches ont démontré leurs très faibles effets antibactériens. Il faut donc ajouter un composant connu toxique comme dans notre cas le NO. La libération de NO par les nanoparticules a des avantages, comparés aux autres molécules libérées par le même procédé comme la libération ne se fait pas avec une décomposition chimique ou une catalyse enzymatique, mais simplement à une exposition des particules à l'eau (G. Han, Friedman, & Friedman, 2011). Grâce à sa qualité lipophile *in vivo*, le NO traverse les membranes cellulaires en suivant un gradient de concentration depuis le lieu de production jusqu'au site.

5.1.3 Nanoparticules d'oxyde de fer couplées au monoxyde d'azote

5.1.3.1 Tests préliminaires microbiologiques

Nos résultats peuvent laisser supposer un effet du NO sur les souches *E.coli* et *S.aureus* (Figure 4.16, 4.17, 4.18). Toutefois, ceci n'est qu'une tendance étant donné certaines difficultés expérimentales. Le fait que les bactéries ne soient pas stables au cours du temps est un paramètre à prendre en considération (nous ne pouvons pas savoir si les bactéries qui meurent en contact avec le NO est dû à l'effet du NO seul). De plus, la quantité de NO utilisée n'est qu'une supposition approximative et les évidences que le NO soit bien attaché à la surface de la nanoparticule ne sont pas claires. Le NO serait peut-être juste en suspension.

Cependant, plusieurs chercheurs ont réussi à démontrer l'effet du NO sur les bactéries comme l'équipe de Mancinelli qui a remarqué, à de faibles concentrations de NO, ce dernier agirait comme un bactériostatique pour certaines bactéries. Cet effet bactériostatique est dû au fait que le NO n'arrive pas à produire des acides qui le rendent toxique. Les bactéries les plus touchées par le NO seraient les bactéries à Gram positif qui ne forment pas de spores, contrairement aux bactéries qui forment des spores et les Gram négatifs qui ne seraient pas

vraiment affectés par le NO. L'équipe de Mancinelli explique ce phénomène par les différences des membranes cellulaires des Gram positifs et Gram négatifs - (Mancinelli R.L & C.P, 1983).

Le monoxyde d'azote aurait peu d'effet antibactérien sur la souche *E.coli* contrairement à *S.aureus*. Le NO aurait deux mécanismes d'action contre les bactéries. La première serait une façon directe où le NO agirait. Étant une molécule lipophile, le NO peut facilement traverser la couche lipidique des bactéries, et ainsi détruire les enzymes métaboliques importantes de ces dernières ainsi que leur ADN. Cette action mènerait à une paralysie de toutes procédures biologiques essentielles au fonctionnement de la bactérie. Le second mécanisme surviendrait de manière indirecte. En contact avec l'air, le NO s'oxyde et peut ainsi produire des espèces réactives nitrosatives (ERN) comme le peroxyde nitrite. Le peroxyde nitrite peut détruire la membrane microbienne à travers la peroxydation lipidique accélérant ainsi la dégradation de l'intégrité cellulaire (A. Friedman et al., 2011). Les espèces réactives de nitrogène modifient l'ADN, les protéines et les lipides. *In vitro*, le NO pourrait désaminer l'ADN en présence d'air (Mancinelli R.L & C.P, 1983). Les ERN vont faire une nitrosation des thiols des protéines ou une nitrosylation du centre métallique de la nanoparticule. Ces deux processus induisent des changements de fonctions des protéines essentielles (A. Friedman et al., 2011). Les nanoparticules composées de NO ont la capacité de changer la structure de la membrane bactérienne et produisent des espèces réactives de nitrogène (ERN) qui vont induire des modifications dans des protéines essentielles pour le fonctionnement de la bactérie (Hajipour et al., 2012).

5.2 Limite de l'étude

5.2.1 Fonctionnalisation du monoxyde d'azote

L'équipe de Seabra a utilisé le même protocole que nous pour attacher le NO. Cette équipe semble avoir fait plusieurs observations de la surface des NPs après la fonctionnalisation au NO cependant les résultats ne sont pas montrés dans les articles ou du moins pas tous (Seabra et al., 2014). Les chercheurs supposent seulement l'attachement du NO à la surface des SPIONs. La concentration de NO est aussi supposée en se basant sur la quantité de liens sulfures et NO (Seabra et al., 2014). En suivant le même protocole, nous avons eu des difficultés à attacher le

NO sur les SPIONs. Le protocole consiste à mettre les nanoparticules d'oxyde de fer soit avec du DMSA ou du MSA. Ces solutions permettent de rendre les nanoparticules thiolées (présence de liens sulfures à la surface). Ensuite, ces nanoparticules thiolées sont mises en contact avec du nitrite de sodium (NaNO_2) qui permet l'attachement du NO sur les liens sulfures. Nos résultats n'ont cependant pas démontré un effet important du NO. C'est pour cela que nous avons effectué des analyses afin de s'assurer de l'attachement du NO. Avec le spectre FTIR, il est possible de déterminer les liens chimiques qui se trouvent dans une particule à l'aide des longueurs d'ondes qu'ils émettent. Nos analyses FTIR sur les nanoparticules d'oxyde de fer couplées au NO montrent plusieurs bandes qui correspondaient aux vibrations émises par certains liens comme -S-N=, -CH₂-S- and -N=O qui prouveraient l'attachement du NO aux SPIONs (Figure 4.8). Ces résultats sont similaires à ceux vus dans la littérature (Zhang et al., 2012). Cependant, nos mesures de NO avec Apollo 1000 (Figure 4.9) montrent qu'il ne semble pas y avoir de NO attaché à la surface des NPs. Ces résultats nous ont poussés à effectuer une deuxième fois l'étude FTIR avec trois échantillons (Annexe II). Le premier échantillon est formé de SPIONs mis en contact avec du DMSA (qui permet de former les liens thiols). Pour cet échantillon, nous nous attendions à trouver des liens S-H. Les deux autres échantillons sont formés de SPIONs mis en contact avec le DMSA et le NO selon le protocole de fonctionnalisation (SPIONs+DMSA+NO). Ces deux SPIONs ont été fonctionnalisées avec le même protocole, mais durant des temps différents (premier lot et deuxième lot de nanoparticules). Pour ces deux échantillons, les liens chimiques supposés observables dans le spectre sont les liens S-H et les liens covalents S-N. Les longueurs d'onde des liens S-H et S-N sont de 2400-2600 cm^{-1} (Colthup, Daly, & E.Wiberly, 1990) et 1400-1600 cm^{-1} respectivement. Or, dans le spectre FTIR, il est possible d'observer, à une longueur d'onde de 2400-2600 cm^{-1} , qu'il n'y a aucune bande (Annexe II). Cette absence de bandes permet de conclure qu'il n'est pas possible de voir les liens S-H et qu'ils seraient absents (Annexe II).

Aux longueurs d'onde de 1400-1600 cm^{-1} , il est possible de remarquer des bandes, mais qui ne sont pas ceux des liens S-N (Annexe II). Premièrement, il n'est pas possible de conclure que ces bandes sont ceux de S-N car il n'y a pas de bande visible pour les liens thiols (S-H) qui sont essentiels à la fonctionnalisation du NO. Deuxièmement, le DMSA qui est la solution permettant d'apporter les liens thiols, ne montre aucune bande de S-H. Il semblerait donc que dans la solution de DMSA, les liens thiols soient inexistants (peut-être à cause d'une dégradation

du produit). Dernièrement, il est connu que le rendement d'une réaction chimique est souvent inférieur à 100%. C'est à dire, que si les bandes à $1400-1600\text{cm}^{-1}$ représentent bien les liens S-N, alors il aurait été possible de voir les bandes des liens S-H à $2400-2600\text{cm}^{-1}$.

D'autres équipes semblent pourtant maîtriser l'attachement du NO avec des SPIONs (Seabra et al., 2014) ou d'autres nanoparticules (A. J. Friedman et al., 2011), mais sans fournir d'évidence analytique (FTIR, XPS ou TOF-SIMS) de cet attachement, ce qui nous fait douter sur l'attachement réel du NO.

5.2.2 Mesure du monoxyde d'azote

La concentration du NO est cruciale pour déterminer l'effet physiologique spécifique. L'équipe de Friedman a déterminé que la concentration de nanoparticules était importante dans la toxicité de ces dernières contre les bactéries. La réduction de la croissance des bactéries était dépendante de la dose de NO administrée (A. Friedman et al., 2011). Il était donc nécessaire de déterminer la concentration de NO sur les SPIONs. Cela a été un réel défi durant ce travail. Lorsque le NO est produit de façon excessive ou ajouté de façon exogène, il peut devenir très toxique envers les cellules (des concentrations 10 à 100 fois supérieures à celles retrouvées physiologiquement, à l'échelle micromolaire) dans un laps de temps court (P. Cabrales, 2011; McCollister, Hoffman, Husain, & Vazquez-Torres, 2011). Ce dernier peut réversiblement inhiber l'oxydase cytochrome-c. Ce phénomène induit une libération de superoxyde (radical libre) depuis la chaîne de transport des électrons. Si la concentration du NO intracellulaire augmente, il y a libération de superoxyde qui va réagir avec le NO. Cette interaction va produire du peroxynitrite qui va faire des dommages irréversibles sur les mitochondries. Il est donc très important de contrôler la concentration de NO.

Après la fonctionnalisation du NO, la mesure de la libération du NO est déterminée à l'aide de la machine Apollo 1000 par méthode d'ampérométrie. Cette machine permet de mesurer le NO en temps réel. Nos résultats n'ont pas permis de déterminer une courbe de libération de NO. Il ne semble pas, selon la Figure 4.9, qu'il y ait du NO dans la solution de SPIONs, ce qui vient appuyer les analyses FTIR.

Cependant Apollo a certaines limites. Afin que le capteur puisse lire une information, il faut qu'il ait une limite de détection. La limite de détection consiste à donner une concentration minimale qui peut être détectée de façon fiable. Cette spécification est liée au bruit du capteur. Les meilleurs capteurs sont ceux qui ont une détection de limite faible et une très haute sensibilité. Ainsi avec deux capteurs différents, la mesure du NO diffère. De plus la sélectivité d'Apollo 1000 est faible. En effet, nous cherchons à regarder la concentration de NO uniquement, mais dans la suspension étudiée nous pouvons rencontrer d'autres molécules. Ces molécules peuvent être en compétition face au capteur. De plus, le NO ayant un temps de demi-vie très court, il se pourrait qu'il n'atteigne pas le capteur, et ne pourrait donc pas être mesuré. Les résultats obtenus ne permettaient pas de conclure qu'il y avait une libération de NO (la courbe de libération n'a pas la forme supposée) (Friedman et al., 2008). Le NO a une diffusion rapide, une haute réactivité et une demi-vie courte ce qui rend les mesures de sa libération un grand défi (Coneski & Schoenfisch, 2012; Hetrick & Schoenfisch, 2009; Hunter et al., 2013). Des collègues ont utilisé cette même machine et ont réussi à avoir une belle courbe de libération de NO (Zhang et al., 2012). Apollo 1000 nécessite une recalibration fréquente pour bien fonctionner.

D'autres méthodes existent pour mesurer le NO. Chacune d'entre elles a des avantages et des limites. La méthode la plus communément utilisée est le test de Griess. C'est une méthode qui a un coût bas, des procédures simples et les résultats sont donnés rapidement (Bryan & Grisham, 2007; Hetrick & Schoenfisch, 2009; Hunter et al., 2013). Le test de Griess utilise l'auto-oxydation du NO en NO_2 . Cette molécule réagit avec les réactifs de Griess. Suite à cette réaction, l'absorbance de la solution est mesurée. Cette absorbance permet de déterminer la quantité de NO_2 présent et par extrapolation la quantité de NO, en supposant que du NO_2^- n'ait pas produit autrement que par l'auto-oxydation du NO. Lors de l'oxydation du NO, ce dernier peut s'oxyder en NO_3^- . Cette molécule n'est pas reconnue par le test de Griess, ainsi cela peut donner de mauvais résultats sur la quantité réelle du NO (Coneski & Schoenfisch, 2012). Ainsi ce test est dépendant de la composition de la solution (comme le tampon utilisé). De plus avec cette méthode, des mesures en temps réel ne sont pas faisables dû aux réactions chimiques à effectuer et de l'extrapolation (concentration indirecte) avant d'obtenir la concentration de NO (Coneski & Schoenfisch, 2012). La limite de détection du NO est de $\sim 0.5 \mu\text{M}$ (Hunter et al., 2013).

La deuxième méthode est plus coûteuse, mais donne plus d'informations détaillées sur la concentration de NO sans demander des étapes de réactions (donc les résultats sont obtenus

directement et sans extrapolation) en utilisant une réaction avec l'ozone (Hunter et al., 2013). Cette méthode est la chimiluminescence (Bryan & Grisham, 2007; P. Cabrales et al., 2010; Coneski & Schoenfisch, 2012; Hunter et al., 2013). Cependant la chimiluminescence nécessite de travailler sous des conditions anaérobiques (Coneski & Schoenfisch, 2012).

L'électrochimie a un coût se situant entre le test de Griess et la chimiluminescence (P. Cabrales et al., 2010). Avec cette méthode, il est possible d'analyser le NO à l'intérieur des cellules (*in situ*). Elle détermine la réduction des électrons. Le courant est par la suite mesuré et comparé à une courbe de calibration et ainsi la concentration de NO est déterminée. Cependant une des limites de cette méthode est qu'elle est faiblement sensible, peut interférer avec l'oxygène et dépend de la température (la libération de NO diffère selon la température ambiante ou la température physiologique) (Coneski & Schoenfisch, 2012; Privett, Shin, & Schoenfisch, 2010).

5.2.3 Tests microbiologiques

Nos tests devaient assurer que les bactéries ne meurent pas dans le PBS pour la durée totale de l'expérience. Il ne fallait pas non plus qu'il y ait une croissance bactérienne. La quantité de bactéries restait relativement stable pour ne pas ajouter des facteurs qu'il aurait été difficile de départager de l'effet des NPs. Ces conditions ont dû être établies pour *E.coli* et *S.aureus*. Ainsi, l'effet qui pourrait être observé après l'expérience est dû seulement à l'action des particules et non pas à une mort ou croissance des bactéries. Un milieu nutritif permet une croissance trop rapide des bactéries. Il est connu que le protéose peptone est un milieu qui est composé de nutriments (peptides et protéines du lait) permettant la survie des bactéries. Ces protéines et peptides peuvent s'adsorber sur les nanoparticules. Étant donné que nous utilisons des bactéries de différentes souches, elles ne réagissent pas de la même manière au milieu. Une étude microbiologique a dû être effectuée pour déterminer la concentration nécessaire pour chaque souche de protéose peptone afin de garder la quantité en bactéries stable. Ces expériences ont été faites 3 fois pour chaque souche, et chaque expérience est faite en triplicata. Cependant, dépendamment des souches, le milieu nutritif n'est pas le même (la concentration en protéose peptone diffère et ainsi la quantité de peptides et protéines de lait présentes dans cette solution change).

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6.1 Conclusion

La nanotechnologie est un domaine prometteur pour les traitements antibactériens. Nous avons pu observer que la taille des particules jouait un rôle crucial dans la toxicité. Il a été clairement vu que les microparticules avaient une toxicité moindre que les nanoparticules. D'autres paramètres rentrent en compte pour la toxicité des nanoparticules : leur composition. Nous avons pu voir que le cuivre et l'oxyde de cuivre sont des candidats très intéressants pour les traitements antibactériens. Ils ont une toxicité élevée cependant la littérature a montré que ces nanoparticules n'étaient pas biocompatibles, du moins à des doses trop élevées. Elles peuvent être plus utilisées dans des surfaces qui ne seront pas en contact avec les cellules humaines (conduits d'aération, tuyaux). Nous avons aussi démontré que les NPs de cuivre supposé pur, s'oxydent en contact de l'air. De plus, en raison de la réactivité des NPs métalliques et donc du phénomène de la corona, aucune technique disponible ne permet actuellement de tester la toxicité des NPs pures.

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des candidats de choix pour le domaine biomédical. Leur biocompatibilité est la propriété qui nous intéresse ainsi que leur magnétisme et hyperthermie (pour un éventuel guidage des particules au site désiré). Cependant, ces dernières n'ont pas une toxicité suffisante pour détruire les bactéries. L'ajout de NO comme agent antibactérien augmenterait la toxicité des NPs. Cependant, nous avons rencontré plusieurs obstacles pour la fonctionnalisation du NO à la surface des NPs. Nos études préliminaires ont mis en lumière les difficultés d'attachement du NO aux SPIONS et de mesure du NO. Toutefois, en se basant sur les travaux en cours de deux autres équipes (Friedman et Schoenfisch), il est clair que le NO a une activité antibactérienne.

Dans une perspective plus lointaine, les nanoparticules d'oxyde de fer couplées au NO serviraient comme traitement antibactérien afin de prévenir les infections nosocomiales. Il est possible aussi, en imitant la biologie, d'utiliser un cocktail de molécules en plus du NO qui agirait en synergie pour tuer les bactéries. Ainsi cela permettrait de venir à bout de la résistance bactérienne.

6.2 Recommandations pour travaux futurs

6.2.1 Caractérisations physico-chimiques

Un phénomène qui arrive dès le contact des NPs avec le milieu nutritif est de former une couche de protéines à la surface des NPs. Ce phénomène s'appelle la corona (Mbeh et al., 2012) (M. Rahman, Laurent, Tawil, Yahia, & Mahmoudi, 2013). La figure 4.8 montre des analyses FITR effectuées sur les NPs de Cu et CuO immergées dans du milieu bactérien. Il serait envisageable d'approfondir ces expériences de caractérisations des NPs en contact avec le milieu bactérien afin d'observer plus précisément ce qui se passe au niveau moléculaire et l'effet de différentes doses de protéose peptone sur la toxicité des bactéries.

6.2.2 Fonctionnalisation et mesure du NO

Des difficultés ont été rencontrées pour la fonctionnalisation du NO malgré que la première tentative semble avoir fonctionné. Actuellement, les NPs d'oxyde de fer ne semblent pas détenir une composition idéale pour pouvoir ajouter des liens disulfures à leur surface (et ainsi attacher le NO). Nous suggérons, pour avoir une fonctionnalisation, le recouvrement avec un polymère, PEG. PEG permet, dépendamment de la quantité, de contrôler la libération de NO (Martinez, 2012), en agrandissant les pores le NO se libère plus rapidement et à de plus hautes concentrations (G. Han et al., 2011; Saraiva, Marotta-Oliveira, Cicillini, Eloy Jde, & Marchetti, 2011). La libération de NO est dépendante de la méthode de préparation sécurisant ainsi la libération seulement en environnement aqueux. La libération de NO peut être modulée en variant la matrice constituant le PEG (Martinez, 2012). Actuellement, dans le groupe du LIAB, des études sont effectuées pour ajouter et contrôler une couche de PEG qui permettrait d'avoir un attachement solide (en ayant une bonne quantité de liens sulfures) et permettrait d'augmenter la dose de NO.

Nous avons vu qu'il existe différentes méthodes pour mesurer le NO qui ont toutes des avantages et des limites. Il faudrait, dans les projets à venir, déterminer la méthode la plus adéquate pour ce genre de mesure. Si ces deux paramètres sont bien maîtrisés alors il est possible

de jouer avec différentes concentrations de NO et ainsi déterminer la dose nécessaire pour détruire les bactéries.

6.2.3 Tests microbiologiques

Les méthodes utilisées pour déterminer si les NPs sont bactéricides ou bactériostatiques (la CMI et la CMB), sont des méthodes bactériologiques utilisées communément pour les antibiotiques. Les antibiotiques sont enlevés, ou leurs effets sont arrêtés après l'expérience. Dans notre étude, la difficulté rencontrée a été de savoir si les NPs ont un effet bactéricide ou un effet bactériostatique. Idéalement, avant de faire les décomptes de bactéries après contact avec les NPs, il aurait fallu séparer les nanoparticules des bactéries, mais elles restent en contact avec les bactéries après l'arrêt de l'expérience. Nous avons essayé d'utiliser la centrifugeuse pour essayer de différencier les bactéries des NPs. Mais les NPs n'étaient pas en suspension. Donc les NPs se retrouvaient en bas du tube dans le culot, avec les bactéries. Nous avons voulu utiliser un filtre assez petit pour laisser passer seulement les NPs et non les bactéries. Mais cette méthode laisserait passer les NPs libres et non pas celles attachées aux bactéries. Il est nécessaire de déterminer une méthode pour enlever les NPs après le temps de contact voulu. Les études qui s'intéressent à diverses nanoparticules et leurs effets antibactériens ne semblent pas enlever les NPs du milieu après les expériences ou du moins n'en parlent pas dans leurs articles (Hajipour et al., 2012; Ren et al., 2009). Il devrait y avoir une adaptation des tests microbiologiques, utilisés pour les antibiotiques, pour les NPs.

Le NO, même après arrêt de l'expérience, est toujours présent dans la solution et peut donc toujours avoir un effet sur les bactéries au-delà de l'expérience. Les articles dans la littérature ne semblent pas prendre compte ce phénomène qui peut jouer sur l'analyse de la toxicité des bactéries (Hetrick et al., 2009; Nablo, Rothrock, et al., 2005; Sun, Slomberg, Chudasama, Lu, & Schoenfisch, 2012). Il a fallu donc trouver un moyen pour arrêter l'effet du NO. Il existe plusieurs scavenger (molécule qui arrête l'action de particules précises). L'un des scavengers trouvé et intéressant du NO est le phenyl-tetramethylimidazolineoxyl-oxide (PTIO) (Cao & Reith, 2002; Jinfang et al., 2008). Très peu d'études utilisent le PTIO avec les bactéries pour un modèle in vitro. Il faut donc déterminer la concentration qui permettrait de canaliser le NO sans avoir d'effets toxiques sur les bactéries. Le PTIO est un radical stable qui peut oxyder le

NO en NO₂ de manière stœchiométrique et qui peut complètement abolir l'activité biologique du NO *in vitro* comme *in vivo* (Maeda, 1994). De plus, dès qu'il est en contact avec un milieu aqueux et/ou de l'air, il peut interagir avec ces derniers pour former d'autres molécules réactives comme l'acide nitreux (HNO₂). Il serait aussi préférable d'utiliser des scavengers pour ces espèces réactives de nitrogène pour neutraliser leur action après l'expérience. Trouver des scavengers spécifiques est très difficile (Patel et al., 1999). La dihydrorhodamine (DRH) peut être utilisée comme scavenger d'espèces réactives de nitrogène (Kalyanaraman et al., 2012). Cependant, cet agent fluorescent n'est pas spécifique. Il est nécessaire de déterminer les molécules que produit le NO et par conséquent de trouver les scavengers adéquats.

Le mode d'action des NPs pour tuer les bactéries n'est pas très bien connu (Choi & Hu, 2009), mais il semblerait que les NPs utilisent les ERO. Pour les NPs couplées au NO, se rajoutent à ce mécanisme les espèces réactives de nitrogène (ERN). Des chercheurs ont déterminé l'effet des ERO produites par les cellules immunitaires. Ces cellules produisent les ERO afin de tuer les bactéries. Les ERO ont pour cible l'ADN (F. C. Fang, 2011). La toxicité antibactérienne des ERO est influencée par différents paramètres *in vitro* comme la concentration des ERO, la densité cellulaire des bactéries, la phase de croissance, ou l'activité métabolique de la souche (F. C. Fang, 2011). La réactivité rapide et l'instabilité des ERO rendent leur détection et leur mesure très difficiles dans les systèmes biologiques c'est pour cela que la plupart des méthodes de mesure sont des mesures indirectes et semi-quantitatives (Thannickal & Fanburg, 2000). L'équipe de Choi a mesuré les ERO intracellulaires en utilisant la méthode basée sur la fluorescence. Le dichlorodihydrofluoresceine (DCFDA) est utilisé comme sonde qui se convertit en un agent fluorescent, DCF (Choi & Hu, 2009; Miao et al., 2012; Setsukinai, Urano, Kakinuma, Majima, & Nagano, 2003; Thannickal & Fanburg, 2000). Cette sonde permet de déterminer la concentration du radical libre H₂O₂ de manière indirecte (Kalyanaraman et al., 2012). La dihydrorhodamine (DRH) est utilisée communément pour mesurer la concentration de peroxy-nitrite intracellulaire et ressemble beaucoup au DCFDA. La DRH se convertit en un produit fluorescent : la rhodamine. Tout comme DCFDA, cette molécule n'est pas spécifique ; la conversion de DRH en rhodamine est arbitrée par un intermédiaire (Kalyanaraman et al., 2012). Le lucigénine est utilisé pour mesurer les ROS par la méthode de chimiluminescence. Il peut se réduire et le produit de cette réduction interagit avec le O₂⁻. Cette interaction crée un produit instable qui génère de la lumière (Thannickal & Fanburg, 2000). La seule méthode qui semblerait

mesurer les ERO de manière directe est la spectroscopie par résonance. Cependant cette technique n'est pas très sensible et demande des concentrations de l'ordre du micromolaire pour pouvoir détecter les ERO (Thannickal & Fanburg, 2000).

Les expériences peuvent être faites sur une plus grande quantité de bactéries afin de comprendre l'effet du type de bactéries. Les SPIONs, fonctionnalisés au NO, peuvent être aussi étudiés sur des biofilms de diverses bactéries.

Des expériences de cytotoxicité doivent être effectuées aussi pour déterminer l'effet du NO sur les cellules humaines aux doses tuant les bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), 5967-5982. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.031
- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407(4), 1461-1468. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.10.053
- Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 6003-6009. doi: 10.2147/IJN.S35347
- Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., & Memic, A. (2012). Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3527-3535. doi: 10.2147/IJN.S29020
- Baek, Y. W., & An, Y. J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1603-1608. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.014
- Bagchi, B., Dey, S., Bhandary, S., Das, S., Bhattacharya, A., Basu, R., & Nandy, P. (2012). Antimicrobial efficacy and biocompatibility study of copper nanoparticle adsorbed mullite aggregates. *Materials Science and Engineering*, 32(7), 1897-1905. doi: 10.1016/j.msec.2012.05.011
- Barbeau J., Carl Gauthier, & Payment, P. (1998). Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1019–1028. doi: 10.1139/cjm-44-11-1019
- Behera, & Shekhar. (2012). Characterization and Evaluation of Antibacterial Activities of Chemically Synthesized Iron Oxide Nanoparticles. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 02(04), 196-200. doi: 10.4236/wjnse.2012.24026
- Bendouah, Z., Barbeau, J., Hamad, W. A., & Desrosiers, M. (2006). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngology*, 134(6), 991-996. doi: 10.1016/j.otohns.2006.03.001
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., Friedman, A. J. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine*, 8(8), 1364-1371. doi: 10.1016/j.nano.2012.02.014
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., & Kahru, A. (2010). Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158(1), 41-47. doi: 10.1016/j.envpol.2009.08.017

- Breathnach, A. S. (2013). Nosocomial infections and infection control. *Medicine*, 41(11), 649-653. doi: 10.1016/j.mpmed.2013.08.010
- Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 645-657. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
- Cabralles, P. (2011). Nanoengineering bactericidal nitric oxide therapies. *Virulence*, 2(3), 185-187. doi: 10.4161/viru.2.3.16746
- Cabralles, P., Han, G., Roche, C., Nacharaju, P., Friedman, A. J., & Friedman, J. M. (2010). Sustained release nitric oxide from long-lived circulating nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 530-538. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.034
- Cabrera, N., & Mott, N. F. (1949). Theory of the oxidation of metals. *Reports on Progress in Physics*, 12(163-184). doi: 10.1088/0034-4885/12/1/308
- Cady, N. C., Behnke, J. L., & Strickland, A. D. (2011). Copper-Based Nanostructured Coatings on Natural Cellulose: Nanocomposites Exhibiting Rapid and Efficient Inhibition of a Multi-Drug Resistant Wound Pathogen, *A. baumannii*, and Mammalian Cell Biocompatibility In Vitro. *Advanced Functional Materials*, 21(13), 2506-2514. doi: 10.1002/adfm.201100123
- Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2006). The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27(11), 2331-2339. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.044
- Cao, B.-J., & Reith, M. E. A. (2002). Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. *European Journal of Pharmacology*, 448(1). doi: 10.1016/S0014-2999(02)01908-8
- Carpenter, A. W., & Schoenfisch, M. H. (2012). Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 41(10), 3742-3752. doi: 10.1039/c2cs15273h
- Chatterjee, A. K., Sarkar, R. K., Chattopadhyay, A. P., Aich, P., Chakraborty, R., & Basu, T. (2012). A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against *E. coli*. *Nanotechnology*, 23(8), 085103. doi: 10.1088/0957-4484/23/8/085103
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wan, L. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicological Letters*, 163(2), 109-120. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.10.003
- Choi, O., & Hu, Z. (2009). Role of Reactive Oxygen Species in Determining Nitrification Inhibition by Metallic/Oxide Nanoparticles. *Journal of Environmental Engineering*, 135(1365-1370). doi: 10.1061//ASCE/EE.1943-7870.0000103
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Traversa, E. (2005). Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials*, 17(5255-5262). doi: 10.1021/cm0505244
- Colthup, N. B., Daly, L. H., & E.Wiberly, S. (1990). *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy: Third Edition*

- Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2012). Nitric oxide release: part III. Measurement and reporting. *Chemical Society Reviews*, 41(10), 3753-3758. doi: 10.1039/c2cs15271a
- Darouiche, R. O. (2001). Device-Associated Infections: A Macroproblem that Starts with Microadherence. *Healthcare epidemiology*, 33(9). doi: 10.1086/323130
- Deryabin, D. G., Aleshina, E. S., Vasilchenko, A. S., Deryabina, T. D., Efremova, L. V., Karimov, I. F., & Korolevskaya, L. B. (2013). Investigation of copper nanoparticles antibacterial mechanisms tested by luminescent *Escherichia coli* strains. *Nanotechnologies*, 8(5-6), 402-408. doi: 10.1134/s1995078013030063
- Deupree, S. M., & Schoenfisch, M. H. (2009). Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomaterials*, 5(5), 1405-1415. doi: 10.1016/j.actbio.2009.01.025
- Durmus, N. G., Taylor, E. N., Kummer, K. M., & Webster, T. J. (2013). Enhanced efficacy of superparamagnetic iron oxide nanoparticles against antibiotic-resistant biofilms in the presence of metabolites. *Advanced Materials*, 25(40), 5706-5713. doi: 10.1002/adma.201302627
- Esteban-Cubillo, A., Pecharromán, C., Aguilar, E., Santarén, J., & Moya, J. S. (2006). Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *Journal of Materials Science*, 41(16), 5208-5212. doi: 10.1007/s10853-006-0432-x
- Fahmy, B., & Cormier, S. A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology In Vitro*, 23(7), 1365-1371. doi: 10.1016/j.tiv.2009.08.005
- Fang, F. C. (2011). Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *MBio*, 2(5). doi: 10.1128/mBio.00141-11
- Fang, F. C. (2012). Antimicrobial actions of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 27, S10. doi: 10.1016/j.niox.2012.04.036
- Fang, H. H. P., Xua, L.-C., & Chan, K.-Y. (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 36(19). doi: 10.1016/S0043-1354(02)00207-5
- Fang, J., Lyon, D. Y., Wiesner, M. R., Dong, J., & Alvarez, P. J. J. (2007). Effect of a Fullerene Water Suspension on Bacterial Phospholipids and Membrane Phase Behavior. *Environmental Science and Technology*, 41(2636-2642). doi: 10.1021/es062181w
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), 1089-1093. doi: 10.1126/science.1176667
- Forge, D., Roch, A., Laurent, S., Tellez, H., Gossuin, Y., Renaux, F., Muller, R. N. (2008). Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. *Journal of Physical Chemistry*, 112, 19178-19185. doi: 10.1021/jp803832k
- Frabrega, J., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environmental Science and Technology*, 43(9004-9009). doi: 10.1021/es901706j
- Friedman, A., Blecher, K., Sanchez, D., Tuckman-Vernon, C., Gialanella, P., Friedman, J. M., Nosanchuk, J. D. (2011). Susceptibility of Gram-positive and -negative bacteria to novel

- nitric oxide-releasing nanoparticle technology. *Virulence*, 2(3), 217-221. doi: 10.4161/viru.2.3.16161
- Friedman, A. J., Blecher, K., Schairer, D. O., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Sanchez, D., Nosanchuk, J. D. (2011). Improved antimicrobial efficacy with nitric oxide releasing nanoparticle generated S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide*, 25(4), 381-386. doi: 10.1016/j.niox.2011.09.001
- Friedman, A. J., Han, G., Navati, M. S., Chacko, M., Gunther, L., Alfieri, A., & Friedman, J. M. (2008). Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites. *Nitric Oxide*, 19(1), 12-20. doi: 10.1016/j.niox.2008.04.003
- Ghaffari, A., Miller, C. C., McMullin, B., & Ghahary, A. (2006). Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide*, 14(1), 21-29. doi: 10.1016/j.niox.2005.08.003
- Gokulakrishnan, R., Ravikumar, S., & Raj, J. A. (2012). In vitro antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(5), 411-413. doi: 10.1016/s2222-1808(12)60089-9
- Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Suppl 5). doi: 10.1086/533591
- Gordon, T., Perlstein, B., Houbara, O., Felner, I., Banin, E., & Margel, S. (2011). Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374(1-3), 1-8. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.015
- Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., & Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 325(5946), 1380-1384. doi: 10.1126/science.1175439
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., Ruiz de Larramendi, I., Rojo, T., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10). doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004
- Han, G., Friedman, A. J., & Friedman, J. M. (2011). Nitric oxide releasing nanoparticle synthesis and characterization. *Methods in Molecular Biology*, 704, 187-195. doi: 10.1007/978-1-61737-964-2_14
- Han, G., Martinez, L. R., Mihu, M. R., Friedman, A. J., Joel M. Friedman, & Nosanchuk, J. D. (2009). Nitric Oxide Releasing Nanoparticles Are Therapeutic for *Staphylococcus aureus* Abscesses in a Murine Model of Infection. *Plos Journal*. doi: 10.1371/journal.pone.0007804
- Harris, L. G., & Richards, R. G. (2006). *Staphylococci and implant surfaces: a review. Injury*, 37 Suppl 2, S3-14. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.003
- Hetrick, E. M., & Schoenfish, M. H. (2009). Analytical Chemistry of Nitric Oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2(409-433). doi: 10.1146/annurev-

- Hetrick, E. M., Shin, J. H., Paul, H. S., & Schoenfisch, M. H. (2009). Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials*, 30(14), 2782-2789. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.052
- Hostynek, J. J., & Maibach, H. I. (2004). Copper hypersensitivity: dermatologic aspects. *Dermatologic Therapy*, 17(328-333).
- Huang, N. M., Lim, H. N., Radiman, S., Khiew, P. S., Chiu, W. S., Hashim, R., & Chia, C. H. (2010). Sucrose ester micellar-mediated synthesis of Ag nanoparticles and the antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 353(1), 69-76. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.10.023
- Hunter, R. A., Storm, W. L., Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2013). Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1957-1963. doi: 10.1021/ac303787p
- Husain, M., Bourret, T. J., McCollister, B. D., Jones-Carson, J., Laughlin, J., & Vazquez-Torres, A. (2008). Nitric oxide evokes an adaptive response to oxidative stress by arresting respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7682-7689. doi: 10.1074/jbc.M708845200
- James, S. L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59(4).
- Jia, H., Hou, W., Wei, L., Xu, B., & Liu, X. (2008). The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dental materials*, 24(2), 244-249. doi: 10.1016/j.dental.2007.04.015
- Jiang, W., Yang, K., Vachet, R. W., & Xing, B. (2010). Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy. *Journal of surfaces and colloids*, 26(23), 18071-18077. doi: 10.1021/la103738e
- Jiayin, G., Xiaobao, F., Richard, D., Siwen, X., Jerzy, J., & Maher, B. (2010). Development of Nanopowder Synthesis Using Induction Plasma. *Plasma Science and Technology*, Vol.12, No.2,.
- Jinfang, T., Huijie, Z., Jianping, H., Yanlai, H., Hui, L., & Wencai, Z. (2008). Effects of Exogenous Nitric Oxide on Photosynthesis, Antioxidant Capacity and Proline Accumulation in Wheat Seedlings Subjected to Osmotic Stress. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(307-313).
- Jones, M. L., Ganopolsky, J. G., Labbe, A., & Prakash, S. (2010). A novel nitric oxide producing probiotic patch and its antimicrobial efficacy: preparation and in vitro analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 509-516. doi: 10.1007/s00253-010-2490-x
- Jones, M. L., Ganopolsky, J. G., Labbe, A., Wahl, C., & Prakash, S. (2010). Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 401-407. doi: 10.1007/s00253-010-2733-x
- Jose, G. P., Santra, S., Mandal, S. K., & Sengupta, T. K. (2011). Singlet oxygen mediated DNA degradation by copper nanoparticles: potential towards cytotoxic effect on cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 9. doi: 10.1186/1477-3155-9-9

- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R., Deepak, V., & Gurunathan, S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces*, 79(2), 340-344. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.014
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennerly, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1-6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- Kanninen, P., Johans, C., Merta, J., & Kontturi, K. (2008). Influence of ligand structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles. *Journal of Colloid Interface Science*, 318(1), 88-95. doi: 10.1016/j.jcis.2007.09.069
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1726-1732).
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., & Moller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicological Letters*, 188(2), 112-118. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.014
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H. C., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in vitro* 23(6), 1116-1122. doi: 10.1016/j.tiv.2009.05.015
- Kim, J., Saravanakumar, G., Choi, H. W., Park, D., & Kim, W. J. (2014). A platform for nitric oxide delivery. *Journal of Materials Chemistry*, 2(4), 341. doi: 10.1039/c3tb21259a
- Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Fridkin, S. K. (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 298(15). doi: 10.1001/jama.298.15.1763.
- Laurent, S., & Mahmoudi, M. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2(4).
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36.
- Low, D. E., de Azavedo, J., Weiss, K., Mazzulli, T., Kuhn, M., Church, D., McGeer, A. (2002). Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1295-1301. doi: 10.1128/aac.46.5.1295-1301.2002
- Ludwig K, L., Peter, W., Pius, M., Robert N., G., & Wendelin J., S. (2007). Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environmental Science and Technology*, 41(11). doi: 10.1021/es062629
- Macherla, C., Sanchez, D. A., Ahmadi, M. S., Vellozzi, E. M., Friedman, A. J., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2012). Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of *Candida*

- albicans burn infections. *Frontiers in Microbiology*, 3(193). doi: 10.3389/fmicb.2012.00193
- Mah, T.-F., & O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1). doi: S0966-842X(00)01913-2
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advances Drug Delivery Reviews*, 63(1-2), 24-46. doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006
- Mahmoudi, M., & Serpooshan, V. (2012). Silver-Coated Engineered Magnetic Nanoparticles Are Promising for the Success in the Fight against Antibacterial Resistance Threat. *Acs Nano*, 6 (3). doi: 10.1021/nn300042m
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Milani, A. S., Hafeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces*, 75(1), 300-309. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.044
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid Interface Science*, 336(2), 510-518. doi: 10.1016/j.jcis.2009.04.046
- Mancinelli R.L, & C.P, M. (1983). Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1).
- Mancinelli, R. L., & McKay, C. P. (1983). Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 198-202.
- Martel, S., Mathieu, J.-B., Felfoul, O., Macicior, H., Beaudoin, G., Soulez, G., & Yahia, L. H. (2004). *Adapting MRI Systems to Propel and Guide Microdevices in the Human Blood Circulatory System*. Paper presented at the Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS.
- Martinez, L. R. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles: challenges and future prospects. *Future Science*, 3(10). doi: 10.4155/TDE.12.97
- Mbeh, D. A., Franca, R., Merhi, Y., Zhang, X. F., Veres, T., Sacher, E., & Yahia, L. (2012). In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: biological and cytotoxicological effects. *Journal of Biomedical Materials Research*, 100(6), 1637-1646. doi: 10.1002/jbm.a.34096
- McCollister, B. D., Hoffman, M., Husain, M., & Vazquez-Torres, A. (2011). Nitric oxide protects bacteria from aminoglycosides by blocking the energy-dependent phases of drug uptake. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2189-2196. doi: 10.1128/AAC.01203-10
- McWhirter, M. J., McQuillan, A. J., & Bremer, P. J. (2002). Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZnSe and to TiO₂ monitored by ATR-IR spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(4). doi: 10.1016/S0927-7765(02)00017-6

- Miao, S., Soo, K. H., Zhenmeng, P., Alison, E., & Hong, Y. (2012). Effects of Surface Chemistry on the Generation of Reactive Oxygen Species by Copper Nanoparticles. *American Chemical Society Nano*, 6(3). doi: 10.1021/nn300445d
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H. L., Elihn, K., Moller, L., Leygraf, C., & Wallinder, I. O. (2009). Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small*, 5(3), 389-399. doi: 10.1002/sml.200801220
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 262-270. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02296.x
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., & Yahia, L. H. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 226(1-21). doi: S0378-5173(01)00752-9
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32(8), 967-976. doi: 10.1016/j.envint.2006.06.014
- Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A., & Yahia, L. H. (2000). Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions. *Journal of Applied Physics*, 88(2), 1166. doi: 10.1063/1.373792
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346-2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059
- Nablo, B. J., Prichard, H. L., Butler, R. D., Klitzman, B., & Schoenfisch, M. H. (2005). Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release. *Biomaterials*, 26(34), 6984-6990. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.017
- Nablo, B. J., Rothrock, A. R., & Schoenfisch, M. H. (2005). Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials*, 26(8), 917-924. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.03.031
- Nhiem, T., Aparna, M., Mallik, D., Sinha, A., Suprabha, N., & J. W. T. (2010). Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 5 (277-283). doi: 10.3410/f.718180355.793487092
- Parikh, S. J., & Chorover, J. (2006). ATR-FTIR Spectroscopy Reveals Bond Formation During Bacterial Adhesion to Iron Oxide. *American Chemical Society*, 22(20), 8492-8500. doi: 10.1021/la061359p
- Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., & Darley-Usmar, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411(2-3), 385-400. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00028-6
- Peulen, T. O., & Wilkinson, K. J. (2011). Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environmental Science and Technology*, 45(8), 3367-3373. doi: 10.1021/es103450g

- Privett, B. J., Shin, J. H., & Schoenfisch, M. H. (2010). Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements. *Chemical Society Reviews*, 39(6), 1925-1935. doi: 10.1039/b701906h
- Prucek, R., Tucek, J., Kilianova, M., Panacek, A., Kvitek, L., Filip, J., Zboril, R. (2011). The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(21), 4704-4713. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.039
- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., & Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and surfaces B: Biointerface*, 102, 300-306. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.039
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L. H., & Mahmoudi, M. (2013). *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface* (Vol. 15): Springer.
- Rahman, M. M., Khan, S. B., Jamal, A., Faisal, M., & Aisiri, A. M. (2011). Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. doi: 10.5772/27698
- Rakhmetova, A. A., Alekseeva, T. P., Bogoslovskaya, O. A., Leipunskii, I. O., Ol'khovskaya, I. P., Zhigach, A. N., & Glushchenko, N. N. (2010). Wound-healing properties of copper nanoparticles as a function of physicochemical parameters. *Nanotechnologies*, 5(3-4), 271-276. doi: 10.1134/s199507801003016x
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(6), 587-590. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004
- Ronald N. Jones, & Pfaller, M. A. (1998). Bacterial Resistance: A Worldwide Problem. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 31(2). doi: 10.1016/S0732-8893(98)00037-6.
- Rosmaninho, R., Santos, O., Nylander, T., Paulsson, M., Beuf, M., Benezech, T., Melo, L. F. (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – Evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1176-1187. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.09.008
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707-716. doi: 10.1016/j.actbio.2007.11.006
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine*, 3(1), 20-31. doi: 10.1016/j.nano.2006.11.008
- Saraiva, J., Marotta-Oliveira, S. S., Cicillini, S. A., Eloy Jde, O., & Marchetti, J. M. (2011). Nanocarriers for nitric oxide delivery. *Journal of Drug Delivery*, 2011, 936438. doi: 10.1155/2011/936438
- Schairer, D. O., Chouake, J. S., Nosanchuk, J. D., & Friedman, A. J. (2012). The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*, 3(3). doi: 10.4161/viru.20328

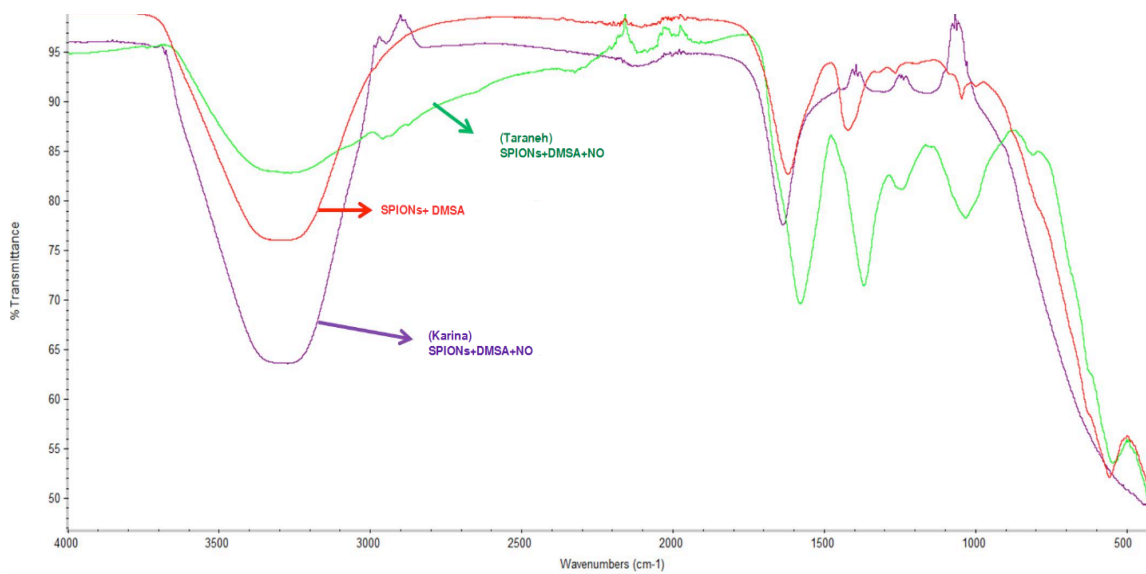
- Schierholz, J. M., & Beuth, J. (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*, 49(2), 87-93. doi: 10.1053/jhin.2001.1052
- Seabra, A. B., Pasquoto, T., Ferrarini, A. C., Santos Mda, C., Haddad, P. S., & de Lima, R. (2014). Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolated- and s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment. *Chemical Research in Toxicology*, 27(7), 1207-1218. doi: 10.1021/tx500113u
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., & Nagano, T. (2003). Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3170-3175. doi: 10.1074/jbc.M209264200
- Shameli, K., Bin Ahmad, M., Jaffar Al-Mulla, E. A., Ibrahim, N. A., Shabanzadeh, P., Rustaiyan, A., . . . Zidan, M. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Callicarpa maingayi* stem bark extraction. *Molecules*, 17(7), 8506-8517. doi: 10.3390/molecules17078506
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006). Control of Flow-Generated Biofilms with Surfactants. *Food and Bioprocess Processing*, 84(4), 338-345. doi: 10.1205/fbp06022
- Simoës, M., & Vieira, M. J. (2009). Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 4(403-11). doi: 10.1080/08927014.2011.579599
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485-1491. doi: 10.1128/jb.185.5.1485-1491.2003
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative Mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2). doi: 0891-5849(94)00159-6
- Sun, B., Slomberg, D. L., Chudasama, S. L., Lu, Y., & Schoenfisch, M. H. (2012). Nitric oxide-releasing dendrimers as antibacterial agents. *Biomacromolecules*, 13(10), 3343-3354. doi: 10.1021/bm301109c
- Szalay, B., Tatray, E., Nyiro, G., Vezer, T., & Dura, G. (2012). Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), 446-453. doi: 10.1002/jat.1779
- Tabrez Khan, S., Ahamed, M., Al-Khedhairy, A., & Musarrat, J. (2013). Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Materials Letters*, 97, 67-70. doi: 10.1016/j.matlet.2013.01.085
- Taylor, E., & Webster, T. J. (2011). Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1463-1473. doi: 10.2147/IJN.S22021
- Taylor, E. N., & Webster, T. J. (2011). *Magnetic Nanoparticles and a Magnetic Field for the Rapid Removal of Device Related Infections*. Paper presented at the IEEE Annual Northeast Bioengineering Conference.

- Teja, A. S., & Koh, P.-Y. (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55(1-2), 22-45. doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology*, 279(6), L1005–L1028. doi: 1040-0605/00
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2011). Nano sized copper particles by electrolytic synthesis and characterizations. *International Journal of the Physical Sciences*, 6(15). doi: 10.5897/IJPS10.116
- Thouvenin, M., Langlois, V., Briandet, R., Langlois, J. Y., Guerin, P. H., Peron, J. J., Vallee-Rehel, K. (2003). Study of erodable paint properties involved in antifouling activity. *Biofouling*, 19(3), 177-186. doi: 10.1080/08927014.2003.10382980
- Verhaegh, W., Richard, M. J., & Hainaut, P. (1997). Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 5699-5706.
- Wahajuddin, & Arora. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3445-3471. doi: 10.2147/IJN.S30320
- Wang, L., Luo, J., Shan, S., Crew, E., Yin, J., Zhong, C. J., Wong, S. S. (2011). Bacterial inactivation using silver-coated magnetic nanoparticles as functional antimicrobial agents. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8688-8695. doi: 10.1021/ac202164p
- Wang, Z., Li, N., Zhao, J., White, J. C., Qu, P., & Xing, B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1512-1521. doi: 10.1021/tx3002093
- Wang, Z. L. (2000). Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *Journal of Physical Chemistry*, 104(6). doi: 10.1021/jp993593c
- Weiss, K. (2002). La résistance bactérienne: la nouvelle guerre froide. *Le Medecin du Quebec*, 37(3).
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397-415. doi: 10.1007/s11671-008-9174-9
- Yoon, K. Y., Hoon Byeon, J., Park, J. H., & Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373(2-3), 572-575. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.007
- Zhang, X. F., Mansouri, S., Mbeh, D. A., Yahia, L. H., Sacher, E., & Veres, T. (2012). Nitric Oxide Delivery by Core/Shell Superparamagnetic Nanoparticle Vehicles with Enhanced Biocompatibility. *Langmuir*, 28(12879–12885). doi: 10.1021/la302357h

ANNEXE 1: Tableau comparatif des différents NPs de Cu et CuO

	Souches	Auteur	Taille NPs	Concentration	Temps d'incubation	Synthèse
Cu	<i>E.coli</i>	Ren, 2009 Raffi, 2010 Chatterjee, 2012	? 12-15nm 80nm	250µg/mL 0.06 mg/mL 12µg/mL	24h 48h 18h	Plasma thermique Réduction du chlorure de cuivre dans un milieu de gélatine
		Cubillo, 2006 Yoon, 2007 Valodkar, 2011 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ramyaidevi, 2012 Deryabin, 2013 (Theivasanthi & Alagar) Giannousi, 2014 Bagchi, 2014	2-5n 90nm 32nm 9.25nm 9.25nm 9.25nm 9.25nm ? 24nm 44nm 10-20nm	1 wt% 33.49µg/mL 0.63mg/L 160µg/mL 260µg/mL 220µg/mL 300µg/mL ? 50µL dans les puits ??? 71.31µg/mL 63.5µg/mL	24h? 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h ??? 24h	Bactéricide <i>E.coli</i> MTCC443 MTCC 739 MTCC 1302 MTCC 1687 Synthèse chimique Haute température condensation Méthode d'électrolyse Méthode hydrothermique Réduction stoechiométrique
	<i>S.aureus</i>	Ren, 2009 Ren, 2009 Ren, 2009 Ren, 2009 Ren, 2009 Betancourt-Galindo, 2014 Cubillo, 2006 Valodkar, 2011 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ruparelia, 2008 Ramyaidevi, 2012 (Theivasanthi & Alagar) Giannousi, 2014	? ? ? ? ? <20nm 2-5nm 32nm 9.25nm 9.25nm 9.25nm 9.25nm ? 24nm 44nm	1000µg/mL 250µg/mL 250µg/mL 1000µg/mL 250µg/mL 1.6mg/mL 1 wt% 1.11mg/L 160µg/mL 160µg/mL 160µg/mL 160µg/mL ? 50µL dans les puits ??? >100µg/mL	24h 24h 24h 24h 24h 16h 24? 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h ????	Plasma thermique EMRSA, Plasma thermique EMRSA, Plasma thermique MRSA, Plasma thermique S.aureus Oxford, Plasma thermique Synthèse chimique, 99% de inhibition Bactéricide NCIM 2079 NCIM 5021 NCIM 5022 Synthèse chimique Méthode d'électrolyse Méthode hydrothermique
		Bagchi, 2012 Bagchi, 2012		25.4µg/mL 50.8µg/mL	24h 24h	Réduction stoechiométrique MRSA, Réduction stoechiométrique
	<i>S.epidermidis</i>	(Mamonova et al., 2013)	75nm	0.01mg/mL	1h	Approche chimique plasmétique. 5000-60000K
CuO	<i>E.coli</i>	Das, 2013 Ren, 2009 Azam, 2012 Azam (2) 2012 Azam (2) 2012 Baek, 2011 Giannousi, 2014 Giannousi, 2014 Ren, 2009	15-30nm 22.4-94.8nm 29.11 nm 20nm 28nm 20-30nm 16nm 12nm 22.4-94.8nm	1mg/mL 0.25 mg/mL 25µg/mL 30µg/mL 95µg/mL 28.6mg/L >100µg/mL 80.93µg/mL 250µg/mL	9h 24h 24 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h	Réduction et pas bactéricide Méthode gel combustion, effet bactéricide Effet bactéricide, synthèse gel combustion ? dose pour inhiber 50% croissance EC50 Méthode hydrothermique Méthode hydrothermique Plasma thermique
	<i>S.aureus</i>	Das, 2013 Ren, 2009 (Azam, Ahmed, Oves, Khan, Habib, et al., 2012) Azam (2) 2012 Baek, 2011 Giannousi, 2014 Giannousi, 2014 Ren, 2009 Ren, 2009 Ren, 2009 Ren, 2009	15-30nm 22.4-94.8nm 29.1nm 20nm 28nm 20-30nm 16nm 12nm 22.4-94.8nm 22.4-94.8nm 22.4-94.8nm 22.4-94.8nm	1mg/mL 2.5mg/mL 22µg/mL 32µg/mL 100µg/mL 65.9mg/L >100µg/mL 96.13µg/mL 2500µg/mL 1000µg/mL 250µg/mL 1000µg/mL	6h 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h 24h	Méthode gel combustion, effet bactéricide Effet bactéricide, synthèse gel combustion ? dose pour inhiber 50% croissance EC50 Méthode hydrothermique Méthode hydrothermique Plasma thermique EMRSA, Plasma thermique EMRSA, Plasma thermique MRSA, Plasma thermique

ANNEXE 2: FTIR des SPIONs fonctionnalisées au NO



ANNEXE 3: Matériels expérimentaux

Milieux de culture

- TSB : milieu de culture pour la croissance bactérienne. Lot:3262268, Becton Dickinson and Company
 - 17.0g de digestion pancréatique de la caséine
 - 3.0g de digestion papaique de germe de soja
 - 2.5g de dextrose
 - 5.0g Chlorure de sodium
 - 2.5g Phosphate dipotassium
- PBS : tampon
 - 4.38g NaCl. Fisher Scientific
 - 3.025g K₂HPO₄. Fisher Scientific
 - 0.85g KH₂PO₄. Fisher Scientific
- Protéose Peptone 0.25% : permet de stabiliser la croissance de la souche *S.aureus*. Former de la digestion enzymatique d'un tissu animal. Becton Dickinson and Company
- Géloses TSA : pour ensemer les bactéries + nanoparticules pour déterminer le CFU
 - TSB
 - Agar Agar
- Tubes de dilution stériles
- Pipettes (5, 10, 25mL)