



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Université de Lorraine**

École Nationale Supérieure de  
Géologie



École Doctorale Ressources  
Procédés Produits Environnement



Laboratoire Environnement et  
Minéralurgie



**Thèse**

présentée à l'Université de Lorraine pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**GÉOSCIENCES**

par

**Jenny Merlin**

---

**PROPRIÉTÉS ÉLECTROSTATIQUES,  
MÉCANIQUES ET CHÉMODYNAMIQUES DE  
(BIO)INTERPHASES MOLLES : ANALYSES EN  
RÉGIME D'ÉQUILIBRE ET TRANSITOIRE**

---

Soutenue publiquement le 04 juin 2012 devant la commission d'examen

Bruno LARTIGES  
José Paulo PINHEIRO  
Claudine FILIATRE  
Pascale BAUDA  
Marc BENEDETTI  
Salaheddine SKALI-LAMI  
Grégory FRANCIUS  
Jérôme DUVAL

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

GET, Toulouse  
CMQE/IBB, Faro, Portugal  
Institut UTINAM, Besançon  
LIEBE, Metz  
LGE, Paris  
LEMMA, Nancy  
LCPME, Nancy  
LEM, Nancy



**Université de Lorraine**

École Nationale Supérieure de  
Géologie



École Doctorale Ressources  
Procédés Produits Environnement



Laboratoire Environnement et  
Minéralurgie



**Thèse**

présentée à l'Université de Lorraine pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**GEOSCIENCES**

par

**Jenny Merlin**

---

**PROPRIÉTÉS ÉLECTROSTATIQUES,  
MÉCANIQUES ET CHÉMODYNAMIQUES DE  
(BIO)INTERPHASES MOLLES : ANALYSES EN  
RÉGIME D'ÉQUILIBRE ET TRANSITOIRE**

---

Soutenue publiquement le 04 juin 2012 devant la commission d'examen

Bruno LARTIGES  
José Paulo PINHEIRO  
Claudine FILIATRE  
Pascale BAUDA  
Marc BENEDETTI  
Salaheddine SKALI-LAMI  
Grégory FRANCIUS  
Jérôme DUVAL

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

GET, Toulouse  
CMQE/IBB, Faro, Portugal  
Institut UTINAM, Besançon  
LIEBE, Metz  
LGE, Paris  
LEMMA, Nancy  
LCPME, Nancy  
LEM, Nancy



## Remerciements

Mes travaux ont été réalisés au sein du Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM), Vandœuvre-lès-Nancy. Je tiens donc à remercier en premier lieu Fabien THOMAS, Directeur du LEM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Jérôme DUVAL pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail de thèse. J'ai eu énormément de chance d'apprendre le métier sous ta direction. Je te remercie pour ta grande disponibilité et pour avoir pris le temps de discuter et de me conseiller. Ces trois années sous ton encadrement m'ont permis de gagner en assurance et comme tu me l'as déjà dit « La Jenny qui a fini cette thèse n'est pas la même que celle qui l'a commencée » et c'est en grande partie grâce à toi.

Je tiens à remercier le Professeur Claudine FILIATRE pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que le Professeur José Paulo PINHEIRO et le Professeur Bruno LARTIGES pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs auprès de l'Université de Lorraine. Je remercie également le Professeur Pascale BAUDA, le Docteur Salaheddine SKALI-LAMI et le Professeur Marc BENEDETTI pour avoir fait partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs. Merci à tous pour l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit et pour le temps que vous y avez consacré.

Bien sûr ce travail est le fruit de l'association de plusieurs personnes en commençant par Grégory FRANCIUS. Je te remercie pour ta gentillesse et pour m'avoir sans cesse rassurée quand je m'écriais que l'adhésion ne marchera jamais. Je te remercie tout particulièrement pour m'avoir initiée à l'AFM, aidée à mettre en place les expériences d'adhésion et pour avoir accepté de juger mon manuscrit de thèse.

Un grand merci à Christophe MERLIN pour m'avoir initiée à la microbiologie. J'ai énormément apprécié cet aspect de mon travail et c'est essentiellement dû à ton enthousiasme et à ta grande disponibilité durant ces trois années.

Je tiens également à remercier Isabelle BIHANNIC. Merci pour t'être autant investie dans divers aspects de ma thèse et en particulier dans le traitement des données sous MATLAB. Merci pour ton soutien et pour avoir apporté par ci par là des idées nouvelles qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie également Pascal ROBERT et Allan BAUER pour leur implication dans la mise au point du dispositif de Relaxation Diélectrique. Un grand merci également à Céline CAILLET et Yves WALDVOGEL pour votre bonne humeur et votre aide précieuse dans les expériences d'électrophorèse.

Un grand grand merci à Marie-Eve KRAPF, Camille RIVARD, Florence GOSSELIN, Noémie TAQUET, Lucie LOVY, Laure PASQUINI, Henriette ADJIA et aussi aux petites dernières Pabla ANTONINI, Jennifer MARTIN et Lucille HASSENBOEHLER. Je vous remercie pour votre soutien et surtout pour votre amitié durant toutes ces années. Bien évidemment, je n'oublie pas Agathe, Alexandre, Catalina, Cristelle, Elise, Erwan, Hania, Jean-Aimé, Lise, Mathilde, Patrice, Reem et Renaud.

Et pour finir, ces remerciements ne seraient pas complets sans citer ma famille. En particulier, mille mercis à mes parents, à mes sœurs Emilie et Laetitia, sans oublier Alice et Serge pour avoir écouté mes histoires d'expériences qui ne marchent pas mais surtout pour m'avoir toujours soutenue. Je tiens également à remercier Gérard et Pascale ainsi que Papi pour m'avoir fait la merveilleuse surprise d'être présents à ma soutenance de thèse. Je finirai juste avec une pensée émue pour Mamie qui aurait aimé être présente à nos côtés.





## Table des Matières

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>9</b>
1.1. Description de l'interface surface-solution : La double couche électrique.....	12
1.2. Electrocinétique statique et applications.....	16
1.2.1. Technique électrocinétique : l'électrophorèse en champ continu (DC).....	16
1.2.2. Application pour l'étude des interactions interparticulaires et de la stabilité colloïdale: la théorie DLVO.....	19
1.2.3. Limites de la théorie DLVO : vers une analyse dynamique des phénomènes électrocinétiques et d'interaction.....	23
1.3. Dynamique de double couche électrique de particules colloïdales.....	27
1.3.1. Processus de polarisation de la double couche électrique et temps caractéristiques associés.....	27
1.3.2. Techniques électrocinétiques en champ alternatif.....	35
1.4. Limites de ces théories : le cas des interphases molles.....	43
1.4.1. Description de l'interphase molle.....	43
1.4.2. Electrocinétique aux interphases molles.....	45
1.4.3. Interactions électrostatiques entre interphases molles.....	51
1.4.4. Détermination des propriétés mécaniques de particules molles : le cas des cellules microbiennes.....	51
1.4.5. Spéciation dynamique d'ions métalliques à des interphases molles.....	53
1.4.6. Développements clés.....	59
 <b>Chapitre 2 : Interactions électrostatiques entre (bio)particules molles multicouches.....</b>	 <b>77</b>
 <b>Chapitre 3 : Analyse de la spéciation dynamique de métaux dans des films minces : couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques .....</b>	 <b>105</b>

---

<b>Chapitre 4 : Electrodynamique d'interphases molles multicouches.....</b>	<b>131</b>
4.1. Théorie. ....	135
4.1.1. Description du système étudié. ....	135
4.1.2. Equations fondamentales. ....	138
4.1.3. Résolution numérique des équations. ....	149
4.2. Résultats et Discussions. ....	150
4.2.1. Impact de la charge de la couche interne, de la perméabilité hydrodynamique de l'enveloppe polymérique et de la force ionique. ....	151
4.2.2. Impact de l'épaisseur des couches molles entourant une particule sur sa mobilité dynamique. ....	163
4.2.3. Impact du rayon du cœur dur de la particule. ....	166
4.2.4. Impact de la concentration en particules dans la suspension. ....	170
4.2.5. Influence du degré d'hétérogénéité dans la distribution de segments polymériques sur la mobilité dynamique.....	173
4.2.6. Impact du nombre de couches perméables $N$ enveloppant des particules en suspension sur leur réponse diélectrique et leur mobilité dynamique. ....	175
4.3. Synthèse des principaux résultats théoriques. ....	178
4.4. Application aux expériences : manipulations exploratoires.....	179
4.4.1. Déroulement des expériences : Test sur des particules de latex. ....	184
4.5. Conclusions et Perspectives. ....	187
<b>Chapitre 5 : Matériels et méthodes expérimentales.....</b>	<b>193</b>
5.1. Présentation de la souche bactérienne <i>Escherichia coli</i> K-12. ....	195
5.1.1. Structure de l'enveloppe de bactéries Gram négatives. ....	195
5.1.2. Présentation des quatre souches mutantes <i>E. coli</i> analysées en Chapitre 6 et 7 de cette thèse. ....	197
5.1.3. Cultures bactériennes. ....	200
5.2. Suivi de la croissance bactérienne dans des systèmes clos. ....	203
5.3. Mesure de la mobilité électrophorétique des bactéries par microélectrophorèse.....	204

---

5.4. Microscopie à Force Atomique.....	206
5.4.1. Principe de la Microscopie à Force Atomique.....	207
5.4.2. Utilisation en mode imagerie.....	209
5.4.3. La spectroscopie de force.....	210
5.4.4. Préparation des échantillons à analyser.....	213
5.5. Adhésion de bactéries sous écoulement contrôlé.....	213
5.5.1. Cellule d'écoulement.....	213
5.5.2. Protocole expérimental pour l'adhésion de bactéries dans une chambre d'écoulement.....	216
5.5.3. Microscopie à Fluorescence.....	217
5.5.4. Traitement des images.....	218
<b>Chapitre 6 : Impact des structures de surfaces de bactéries <i>Escherichia coli</i> sur leurs propriétés mécaniques et électro-hydrodynamiques .....</b>	<b>225</b>
<b>Chapitre 7 : Etude préliminaire des premiers stades d'adhésion bactérienne sous conditions hydrodynamiques contrôlées .....</b>	<b>259</b>
7.1. Conception de la chambre d'écoulement, et développement du programme MATLAB pour le traitement des clichés d'adhésion.....	262
7.2. Cinétique d'adhésion de bactéries E2146 sur des coupons de verre : résultats préliminaires.....	264
7.3. Conclusions et Perspectives.....	269
<b>Conclusion Générale et Perspectives.....</b>	<b>273</b>







## Introduction Générale

Dans les systèmes naturels (rivières, océans, sols, atmosphère), la matière solide est essentiellement présente sous la forme d'objets finement divisés (de taille inférieure au millimètre) dont les particules colloïdales biotiques (microorganismes bactériens, virus, levures, etc) et les particules colloïdales abiotiques (*e.g.* acides humiques, polysaccharides naturels, etc) sont des représentants majoritaires. Ces colloïdes, qui sont électriquement chargés, développent avec leur milieu environnant une structuration ionique d'interface, appelée double couche électrique, laquelle gouverne, entre autre, leur stabilité vis-à-vis des processus d'agrégation. Plus généralement, les propriétés physico-chimiques (*e.g.* électriques, mécaniques, hydrodynamiques, structurales) de ces colloïdes et de leurs interfaces régissent leurs interactions avec d'autres particules chargées présentes dans leur voisinage ou avec des surfaces (déposition de colloïdes, formation de biofilms\* dans le cas des (bio)particules bactériennes). Ces propriétés contrôlent également les interactions des (bio)colloïdes avec des contaminants (*e.g.* espèces métalliques ioniques ou nanoparticulaires) naturellement présents dans le milieu ou issus des activités humaines. En particulier, de ces interactions entre contaminants métalliques et (bio)colloïdes réactifs résulte une grande diversité de complexes métalliques dont les propriétés physico-chimiques différentes impactent leur réactivité, leur mobilité, leur biodisponibilité<sup>†</sup> ou leur toxicité. Cette diversité de complexes est à mettre en relation avec la diversité de (bio)colloïdes rencontrés dans les milieux naturels, diversité notamment (i) en terme de taille (depuis quelques nanomètres pour *e.g.* les virus et les acides humiques jusqu'au micromètre pour *e.g.* les bactéries ou les agrégats), (ii) en terme de géométrie (sphérique pour les virus et les bactéries de type coque – en bâtonnet pour les bactéries de type bacille, etc), (iii) en terme de propriétés et d'hétérogénéités électrostatiques, mécaniques et chimiques, ou encore (iv) en terme de nature des particules (minérales, organiques).

---

\* Communauté structurée de cellules microbiennes incluses dans une matrice de polymère autoproduite et adhérentes entre elles et/ou à des surfaces ou interfaces vivantes ou inertes.

† Capacité du milieu aqueux à fournir aux microorganismes des éléments qu'ils peuvent potentiellement assimiler.

Les (bio)particules naturelles comme les bactéries, les virus ou encore les acides humiques sont par définition des particules molles. Par opposition aux particules dures, *i.e.* aux particules rigides et imperméables aux ions et solvants, les particules molles présentent une flexibilité mécanique et une perméabilité hydrodynamique aux ions et aux flux hydriques. Cette mollesse mécanique et hydrodynamique provient essentiellement de la présence de structures souples type polyélectrolyte (polymère chargé) dans le volume de la particule ou à sa surface. On peut citer à titre d'exemple, la présence de la membrane cellulaire et d'appendices de surface pour les bactéries (lipopolysaccharides, les flagelles, les *pili*, les *fimbriae*, la capsule ou encore des protéines), la présence de capsides protéiques périphériques pour les virus ARN F-spécifiques, ou encore la présence de dépôts organiques tridimensionnels complexes chargés, ou biofilms, sur des surfaces dures argileuses. S'agissant de ces particules naturelles molles, ubiquistes dans l'environnement, il est alors physiquement plus réaliste de remplacer le terme interface, classiquement utilisé, par interphase, indiquant ainsi que la structuration de la double couche électrique est non seulement dépendante des processus physico-chimiques localisés à la surface même de l'objet mais aussi dans l'espace intra-particulaire ou intra-substrat. Ces différentes caractéristiques nécessitent une refonte importante des formalismes théoriques couramment utilisés pour prédire, quantifier et interpréter les interactions des particules colloïdales naturelles (essentiellement molles par nature) et leur réactivité en milieu aqueux. Ces formalismes ne sont strictement valables, en effet, que pour des particules dures, imperméables et homogènes dans des conditions peu réalistes de charge et géométrie. Parmi ces formalismes, on peut citer les modèles DLVO ou DLVO étendu pour estimer les interactions colloïdales répulsives et attractives, les modèles Stern et Gouy-Chapman pour représenter la composition ionique de double couche électrique à l'interface particule dure/électrolyte, et les modèles de Smoluchowski, Helmholtz ou Debye-Hückel pour évaluer les propriétés communément dites 'de surface' de particules dures à partir d'observables électrocinétiques.

L'un des objectifs de cette thèse sera de considérer explicitement la présence de ces structures molles tridimensionnelles chargées dans l'évaluation des interactions électrostatiques interparticulaires, dans l'évaluation des propriétés électrohydrodynamiques et mécaniques (élasticité) de ces particules ainsi que dans l'estimation de leur capacité à fixer des contaminants métalliques (métaux lourds).

Outre les considérations ci-dessus portant sur le caractère mou des (bio)particules de relevance environnementale, il est important de souligner que les milieux naturels aquatiques ne sont généralement pas à l'équilibre thermodynamique. En effet, les (bio)colloïdes qui les composent sont sans cesse soumis à des contraintes électriques, hydrodynamiques et/ou mécaniques issues des interactions qu'ils entretiennent avec des ions ou d'autres colloïdes présents dans le milieu. Sous l'effet de ces perturbations continues, les (bio)interphases colloïdales et leurs propriétés physico-chimiques évoluent sans cesse dans le temps, selon des processus dits de relaxation, depuis un état initial vers un état transitoire ou un état stationnaire (lequel ne correspond pas nécessairement à un état d'équilibre thermodynamique). Il est alors nécessaire d'identifier ces processus, de quantifier leur évolution temporelle et ainsi évaluer la dynamique hors-équilibre des propriétés physico-chimiques de (bio)interphases suite à une perturbation électrique et/ou mécanique, par exemple. En d'autres termes, il s'agit d'analyser la dynamique des (bio)interphases colloïdales, celle de leur double couche électrique et celle de leurs interactions avec d'autres particules ou surfaces, et ce depuis le régime transitoire hors-équilibre qui suit la perturbation jusqu'à l'établissement éventuel d'un état stationnaire ou d'équilibre.

La relaxation des (bio)interphases suite à une perturbation électrique et/ou mécanique impacte ainsi divers phénomènes interfaciaux impliqués dans *e.g.* les interactions électrostatiques, ou la spéciation de métaux fixés par des particules ligands colloïdales. Tous ces phénomènes étant donc par nature dynamiques (cette dynamique concerne les échelles de temps *et* d'espace), il convient de constater que les aspects dynamiques inhérents à ces phénomènes sont peu ou pas abordés dans la littérature où des descriptions plus statiques sont reportées (la célèbre théorie DLVO en est une illustration). Prenons l'exemple particulier des interactions électrostatiques entre particules colloïdales. Suite au recouvrement de leurs doubles couches électriques respectives, ces particules et leurs interphases en interaction sont soumises à des sollicitations électriques entraînant une déviation de leurs propriétés physico-chimiques par rapport à leur état relaxé ou non perturbé et ce pendant tout le processus d'interaction. Prenons par ailleurs l'exemple des processus gouvernant la spéciation de cations métalliques dans des suspensions de (bio)particules ligands. La prise en compte de la dynamique des (bio)interphases dans la quantification des mécanismes chémodynamiques (définis par le couplage entre transport des métaux depuis/vers la particule réactive et cinétique de complexation locale au sein de la structure molle) est également indispensable

puisque les cations métalliques peuvent eux-mêmes participer à l'établissement de la double couche électrique ou encore rigidifier la structure molle *via* la formation de liaisons fortes avec les sites réactifs portés par les chaînes formant la structure molle. En d'autres termes, l'interconversion chimique des métaux entre leur forme libre et leur forme complexée modifie la composition de la double couche électrique de la particule ligand et peut entraîner une réorganisation de l'interphase *via* des processus de rétraction des structures réactives.

Dans ce contexte, une étude approfondie des mécanismes contrôlant le devenir (écodynamique) des (bio)particules colloïdales naturelles molles et des contaminants ioniques dans les écosystèmes aquatiques, nécessite une analyse fine dans le temps des déterminants physico-chimiques de (bio)interphases suite à une perturbation électrique et/ou mécanique ainsi qu'une étude dans le temps de leurs interactions. Les déterminants physico-chimiques importants de particules colloïdales molles qui seront abordés dans ce manuscrit sont :

- leurs propriétés électrostatiques (densité de charge portée par la particule)
- leurs propriétés hydrodynamiques (perméabilité de la particule aux ions et aux flux hydriques)
- leurs propriétés mécaniques (élasticité des structures molles portées par la particule)
- leurs propriétés structurales (taille, géométrie de la particule, hétérogénéités chimiques, etc)

Plus spécifiquement le manuscrit de thèse s'organise de la façon suivante.

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique des principaux travaux reliés à la problématique de cette thèse. Nous insisterons notamment sur l'importance d'intégrer les processus dynamiques d'interphase (ou de double couche) pour l'évaluation des phénomènes interfaciaux tels que les interactions électrostatiques interparticulaires ou la spéciation de métaux dans des suspensions de particules ligands colloïdales. Nous terminerons en explicitant les points clés développés dans ce manuscrit.

Les trois chapitres suivants seront dédiés au développement de formalismes théoriques pour une meilleure compréhension des interactions qu'entretiennent des (bio)interphases avec leur milieu environnant dans les régimes d'équilibres thermodynamiques et/ou les régimes transitoires. Plus précisément dans le second chapitre, nous nous intéresserons à l'évaluation théorique de l'énergie d'interactions électrostatiques entre (bio)systèmes mous en régime

d'équilibre et en prenant en compte de manière explicite la répartition tridimensionnelle non-homogène des charges dans les structures molles des particules. L'approche développée permet par ailleurs la considération des effets de taille de particules molles (courbure) sur leurs interactions et, en ce sens, constitue une extension inédite du formalisme de Derjaguin. De plus, le modèle théorique s'affranchit des approximations de Debye-Hückel qui sont exclusivement pertinentes pour des systèmes particuliers portant des charges de faible amplitude. Le troisième chapitre est consacré à une étude théorique visant à comprendre la dynamique de spéciation hors-équilibre de cations métalliques dans un film polymérique mou qui contient en son sein des sites réactifs susceptibles de fixer ces cations. Cette étude permet pour la première fois une analyse en régime hors-équilibre du couplage complexe entre (i) les processus chémodynamiques définis par le transport des métaux depuis/vers le film réactif *et* la cinétique de complexation locale au sein du film, et (ii) les processus électrodynamiques, c'est-à-dire l'établissement dans l'espace et le temps de la double couche électrique formée entre le film et la solution aqueuse contenant les métaux. Dans le quatrième chapitre nous analyserons plus spécifiquement l'électrodynamique de (bio)particules molles composées de structures polymériques concentriques présentant des épaisseurs, des hétérogénéités et des densités de charges différentes (c'est le cas des particules virales, des bactéries) en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu de suspension (force ionique, concentration en particules). Cette analyse de la dynamique d'établissement de double couche électrique à des interphases molles multicouches sera effectuée depuis les régimes transitoires, qui suivent la perturbation électrique imposée au système, jusqu'au régime stationnaire ou relaxé. Nous terminerons ce quatrième chapitre par une description des différentes étapes nous ayant amené au développement d'un dispositif expérimental dans le but de confronter ultérieurement nos résultats théoriques à des données acquises sur des systèmes biologiques. Cette dernière étude est actuellement menée dans le cadre d'un travail de thèse débuté en octobre 2011.

Dans les chapitres 5 à 7, nous présenterons les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse. En détails, dans le Chapitre 5 nous décrirons les (bio)particules modèles analysées (*Escherichia Coli* modifiées génétiquement de manière à exprimer sélectivement certains types de structures molles) et les différentes techniques expérimentales utilisées pour déterminer leurs propriétés électrostatiques, hydrodynamiques, mécaniques et morphologiques en régime relaxé dans différentes conditions de force ionique. L'analyse de

ces différentes propriétés sera l'objet du Chapitre 6. Dans le Chapitre 7 nous reporterons des expériences exploratoires ainsi qu'un protocole mis au point pendant la thèse pour l'investigation de la cinétique d'adhésion des souches bactériennes *Escherichia Coli* sur des surfaces de verre dans une chambre à flux hydrodynamique tangentiel contrôlé.

Enfin nous concluons ce manuscrit en résumant les avancées principales réalisées ainsi que les perspectives de recherche liées à ce travail.





## **Chapitre 1**

# **Synthèse Bibliographique**



Dans ce chapitre bibliographique, nous présenterons les principales notions et les principaux travaux nécessaires pour la compréhension des problématiques développées pendant cette thèse, c'est-à-dire :

- la détermination des propriétés électrostatiques, hydrodynamiques et/ou mécaniques de (bio)particules molles\* dans le régime d'équilibre thermodynamique et/ou dans le régime transitoire qui conduit au régime d'équilibre,
- l'impact de ces propriétés sur la réactivité chimique des (bio)particules molles et leurs interactions électrostatiques.

Dans un premier temps, nous décrirons l'interface que forme une surface dure non perméable aux ions et au solvant avec son milieu environnant, c'est-à-dire la double couche électrique.

Nous nous intéresserons ensuite à la détermination des propriétés électrostatiques de ces interfaces *via* l'utilisation de techniques électrocinétiques et à leur impact sur les interactions interparticulaires et la stabilité colloïdale dans le régime d'équilibre. Nous terminerons cette partie en démontrant l'importance de considérer les processus dynamiques de double couche (processus hors-équilibre) pour *e.g.* l'évaluation des interactions électrostatiques entre colloïdes.

La troisième partie sera consacrée à l'étude des processus gouvernant la dynamique de double couche électrique à des interfaces surface dure/solution et à la présentation des techniques électrostatiques en champs électriques pulsés ou non pour les quantifier.

Alors que les trois premières parties portent sur l'étude des particules dures, nous terminerons par le cas plus général des particules molles qui englobe les particules entièrement perméables, les particules composées d'un cœur dur enveloppé d'une structure molle et les particules dures. Après leur description, nous présenterons les principales études et techniques pour évaluer (i) leurs propriétés électrostatiques et hydrodynamiques (dans les régimes d'équilibre et hors-équilibre), (ii) leurs interactions électrostatiques, (iii) leurs propriétés mécaniques et (iv) la spéciation de cations métalliques à ces interfaces molles.

---

\* Particules présentant un degré de perméabilité aux flux ioniques et hydrodynamiques dû à la présence au niveau de la particule de structures perméables chargées (détails dans l'introduction générale de ce manuscrit et dans le §1.4 de ce chapitre)

Nous concluons ce chapitre bibliographique avec une description brève des développements clés réalisés durant cette thèse.

### 1.1. Description de l'interface surface-solution : La double couche électrique.

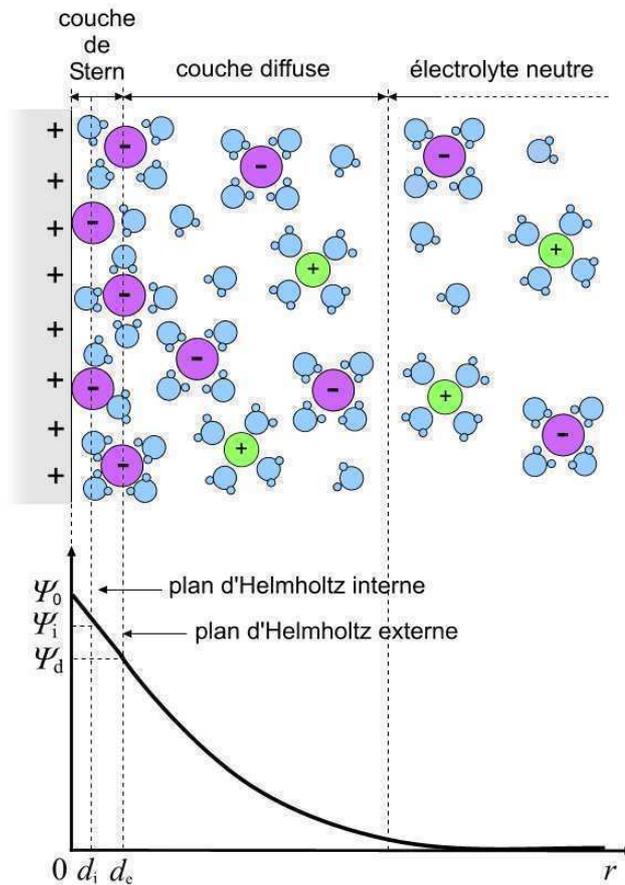
En général, lorsqu'un colloïde est mis en contact avec un milieu aqueux, celui-ci acquiert une charge de surface. Les origines de cette charge superficielle sont multiples. Brièvement, on compte parmi elles [1]

- (i) *l'adsorption spécifique d'ions.* Des ions de type *e.g.* hydroxyde, hydrogène, halogénure ou métallique s'adsorbent à la surface du colloïde.
- (ii) *Adsorption de molécules chargées.* Par exemple, des tensioactifs anioniques ou cationiques s'adsorbent sur la surface du colloïde.
- (iii) *l'adsorption – désorption d'ions.* L'exemple le plus représentatif est celui du cristal d'iodure d'argent (AgI). Lorsque que le cristal AgI est mis en contact avec une solution aqueuse, les ions  $\text{Ag}^+$  et  $\text{I}^-$  se dissolvent dans la solution jusqu'à atteindre  $[\text{Ag}^+][\text{I}^-] = K_S$  où  $K_S$  est le produit de solubilité de AgI. La dissolution préférentielle des ions  $\text{Ag}^+$  par rapport aux ions  $\text{I}^-$  assure l'apparition d'une charge négative à la surface du cristal. L'introduction d'ions  $\text{Ag}^+$  dans la solution (ajout de l'électrolyte  $\text{AgNO}_3$  par exemple) contrôle la dissolution des ions  $\text{Ag}^+$  et modifie la charge de surface. Ces ions sont appelés potentiel (ou charge) déterminants.
- (iv) *l'ionisation et dissociation de groupements de surface.* Dans le cas de surfaces présentant des groupements de nature acido-basique comme les oxydes, la dissociation de ces groupements génère une charge de surface positive ou négative. Le signe et la magnitude de la charge de surface sont déterminés par le pH de la solution électrolyte. Le pH annulant la charge de surface est appelé point de charge nulle.
- (v) *la substitution isomorphe* rencontrée généralement dans le cas des argiles où les ions  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Si}^{4+}$  sont substitués par des ions de valence inférieure produisant une charge de surface négative.

L'établissement d'une densité de charge superficielle, notée  $\sigma_0$ , génère un champ électrostatique et influe sur la distribution des espèces ioniques au voisinage de la surface

avec pour but la neutralisation de cette charge surfacique. Ainsi les ions de charge opposée à celle de la surface, ou contre-ions, sont attirés près de la surface alors que les ions de même charge, ou coions, sont repoussés. Il en résulte l'apparition d'une structure ionique au contact de la surface, appelée Double Couche Electrique (DCE) de manière à ce que la charge totale (de surface et dans la DCE) s'annule.

Plusieurs modèles physiques successifs ont été élaborés afin de décrire l'interface surface chargée-solution électrolyte. Helmholtz proposa de modéliser l'interface sous forme d'un condensateur moléculaire comprenant deux armatures rigides parallèles, la première représentant la surface chargée et la seconde le liquide ionique [2]. Cependant, l'agitation thermique subie par les contre-ions provoque une dispersion de ces mêmes ions dans l'espace. Ce phénomène, en désaccord avec le modèle développé par Helmholtz, est à l'origine du concept de double couche diffuse introduit indépendamment par Gouy [3] et Chapman [4] et connu sous le nom de modèle de Gouy-Chapman. Il consiste en l'existence d'une couche diffuse dans laquelle la distribution des contre-ions et coions, considérés comme des charges ponctuelles, est gouvernée par les interactions électrostatiques attractives et répulsives avec la surface et les processus de diffusion liés aux gradients qui tendent à rétablir l'équilibre avec le cœur de la solution. La distribution de potentiel électrostatique dans la couche diffuse (relative au potentiel dans la solution de cœur où l'électroneutralité est vérifiée) obéit à l'équation de Poisson-Boltzmann (équation (1.3)) et révèle une décroissance exponentielle du potentiel depuis la surface (potentiel de surface  $\Psi_0$ ) jusqu'au cœur de la solution (potentiel nul). Néanmoins l'augmentation exponentielle de la concentration en contre-ions à l'approche de la surface est nécessairement limitée par les tailles et les distances d'approche des ions. C'est pourquoi, en 1924, Stern proposa un modèle dit de double couche conciliant les modèles de Helmholtz et Gouy-Chapman et permettant de rendre compte de la taille finie des ions et de l'agitation thermique [5]. La double couche électrique est représentée schématiquement dans la Figure 1.1. Elle se décompose en une première couche dite compacte, ou appelée encore couche de Stern, solidaire de la surface et en une seconde couche appelée couche diffuse. La couche de Stern est elle-même divisée en deux parties par le plan d'Helmholtz interne (pHi). Au contact de la surface chargée, les ions présents dans le milieu peuvent perdre une partie de leur sphère d'hydratation et s'adsorber spécifiquement sur la surface. Ces ions, localisés sur le pHi sont séparés de la surface par une distance  $d_i$  de l'ordre du rayon des ions.



**Figure 1.1.** Représentation schématique de la double couche électrique. Les espèces ioniques sont représentées avec leur sphère d'hydratation.

Au-delà du pHi, les interactions électrostatiques entre les ions et la surface gouvernent la distribution spatiale des espèces ioniques. Les ions sont alors entourés de leurs sphères d'hydratation et distribués au-delà du plan d'Helmholtz externe (pHe) situé à une distance depuis la surface  $d_e$  de l'ordre du rayon de l'ion hydraté. Le pHe marque la séparation entre la couche de Stern et la couche diffuse. Le potentiel électrostatique à cette position est noté  $\Psi_d$ .

Dans la couche diffuse, la distribution des espèces ioniques suit le modèle de Gouy-Chapman. Les ions sont alors considérés comme des charges ponctuelles et leur distribution est liée au potentiel électrostatique local suivant l'équation de Boltzmann :

$$n_i(\vec{r}) = n_i^* \exp\left(-\frac{z_i e \Psi(\vec{r})}{k_B T}\right), \quad (1.1)$$

où  $\vec{r}$  est la coordonnée radiale dont l'origine est située à la surface chargée.  $n_i(\vec{r})$  et  $n_i^*$  sont les densités en ions  $i$  à la position  $\vec{r}$  et au cœur de la solution, respectivement.  $z_i$  est la valence

de l'ion  $i$ ,  $e$  est la charge élémentaire,  $\Psi(\vec{r})$  est le potentiel électrostatique à la position  $\vec{r}$ ,  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $T$  est la température.

Dans la couche diffuse, la distribution du potentiel électrique est liée à la densité en ions locale par l'équation de Poisson

$$\nabla^2\Psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_0\epsilon_m}\rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_0\epsilon_m}\sum_i z_i e n_i(\vec{r}), \quad (1.2)$$

avec  $\epsilon_0$  la permittivité diélectrique du vide et  $\epsilon_m$  la permittivité relative du milieu.  $\rho(\vec{r})$  représente la densité volumique de charge à la position  $\vec{r}$ . Finalement, la combinaison des équations (1.1) et (1.2) donne l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\nabla^2\Psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_0\epsilon_m}\sum_i z_i e n_i^* \exp\left(-\frac{z_i e \Psi(\vec{r})}{k_B T}\right). \quad (1.3)$$

Pour de faibles valeurs de potentiels telles que  $e\Psi(\vec{r})/k_B T < 1$ ,  $\exp(\Psi(\vec{r}))$  peut être linéarisé. Cette approximation, appelée approximation de Debye-Hückel, permet une résolution analytique de l'équation de Poisson-Boltzmann. Dans le cas d'une surface plane (Figure 1.1), l'application des conditions aux limites  $\Psi(r=d_c) = \Psi_d$  et  $\Psi(r \rightarrow \infty) = 0$  pour la résolution de l'équation (1.3) linéarisée donne :

$$\Psi(r) = \Psi_d \exp(-\kappa(r-d_c)). \quad (1.4)$$

La distribution de potentiel autour d'une sphère de rayon  $a$  est donnée par

$$\Psi(r) = \Psi_d \left(\frac{a+d_c}{r}\right) \exp\{-\kappa(r-(a+d_c))\}. \quad (1.5)$$

où la référence de la coordonnée radiale  $r$  est située au centre de la particule. Les distributions de potentiel (1.4) et (1.5) font intervenir une constante  $\kappa$ , dite de Debye, homogène à l'inverse d'une longueur. Son expression est donnée par :

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_i z_i^2 e^2 n_i^*}{\epsilon_0 \epsilon_m k_B T}}. \quad (1.6)$$

L'épaisseur caractéristique de la double couche électrique peut être assimilée à la longueur de Debye  $\kappa^{-1}$ . Il est à noter que  $\kappa^{-1}$  dépend uniquement des propriétés de la solution électrolytique. Ainsi, l'équation (1.6) montre que plus la force ionique  $I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i^*$  est

élevée (avec  $c_i^* = n_i^*/N_A$  la concentration de l'ion  $i$  au cœur de la solution où  $N_A$  est la constante d'Avogadro), plus la double couche est comprimée.

Afin de déterminer les caractéristiques de la double couche électrique, des techniques électrocinétiques peuvent être utilisées. Celles-ci reposent sur des phénomènes électrocinétiques résultant du mouvement relatif du liquide, au voisinage de la surface, par rapport à la surface chargée (et *vice versa*). Pour illustration, considérons une dispersion de particules colloïdales chargées soumises à un champ électrique établi dans le temps. La présence même d'une double couche autour des particules, portant une charge électrique non nulle, entraîne leur mouvement sous l'action du champ. L'environnement ionique autour de la particule chargée est constitué de deux régions spatiales distinctes : une couche stagnante au contact de la surface et une couche mobile non-solidaire de la surface. Dans la couche stagnante, les ions présentent une affinité importante pour la surface formant ainsi une couche de fluide dont la viscosité est plus élevée que dans la solution de cœur. Cette couche ne suit pas le mouvement hydrodynamique du liquide mais reste figée. Un plan de coupure hydrodynamique, ou plan de cisaillement, marque la frontière entre le liquide « au repos » et le liquide en mouvement. Le potentiel au plan de cisaillement est couramment noté potentiel- $\zeta$  (potentiel zêta). Il est d'usage d'assimiler le potentiel  $\Psi_d$  au potentiel- $\zeta$  expérimentalement accessible *via* l'utilisation de techniques électrocinétiques comme l'électrophorèse dans le cas de suspensions colloïdales.

## 1.2. Electrocinétique statique et applications.

### 1.2.1. Technique électrocinétique : l'électrophorèse en champ continu (DC).

Bien que l'ensemble particule – DCE forme un ensemble électriquement neutre, une particule chargée est mise en mouvement sous l'effet d'un champ électrique continu  $\vec{E}_0$ . Ce phénomène électrocinétique est appelé électrophorèse. Le déplacement de la particule, et de la couche stagnante l'enveloppant (§1.1), est la conséquence de multiples forces externes électriques et hydrodynamiques agissant sur la particule même et sur son environnement ionique. Les différentes forces mises en jeu sont :

- (i) *les forces électrostatiques* exercées par le champ électrique sur la charge portée par la particule

- (ii) *les forces de friction* ralentissant la particule du fait de la viscosité du milieu ionique
- (iii) *les forces dites de « retardement électrophorétique »* liées au mouvement des contre-ions dans la DCE. Ainsi, lorsque la particule se déplace dans un sens donné (suivant sa charge), les contre-ions dans la DCE se déplacent dans le sens inverse et entraînent une partie du fluide. La vitesse de la particule est alors réduite. Ce phénomène est d'autant plus marqué que  $\kappa a$  est faible.
- (iv) *les forces originaires des effets de relaxation*. En l'absence de champ électrique, le centre des charges portées par la particule et le centre des charges portées par son environnement ionique (composé de contre-ions en majorité), coïncident. Cependant, après application du champ électrique, la double couche électrique se déforme et perd sa symétrie sphérique séparant les centres de charges [6]. Un champ électrostatique local apparaît en opposition au champ électrostatique appliqué  $\vec{E}_0$ . Il en résulte un ralentissement de la particule.

Sous l'effet du champ, la particule chargée se déplace. A condition que la magnitude du champ reste suffisamment faible (électrocinétique du premier ordre), la particule atteint une vitesse constante  $v_e$  proportionnelle à la force du champ appliqué :

$$v_e = \mu_e E_0, \quad (1.7)$$

où  $\mu_e$  représente la mobilité électrophorétique correspondant à la grandeur mesurée lors des expériences d'électrophorèse. En supposant que les forces électrostatiques et de friction ((i) et (ii)) sont les seules forces agissant sur la particule, si l'épaisseur de la DCE est faible devant le rayon de la particule ( $\kappa a \gg 1$ ), la mobilité électrophorétique  $\mu_e$  est définie par l'équation d'Helmholtz – Smoluchowski (HS) [7-8] :

$$\mu_e = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta}, \quad (1.8)$$

Lorsque la longueur de Debye est très grande devant le rayon  $a$  de la particule ( $\kappa a \ll 1$ ),  $\mu_e$  est définie par l'équation d'Hückel – Onsager (HO) [7, 9] :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta}, \quad (1.9)$$

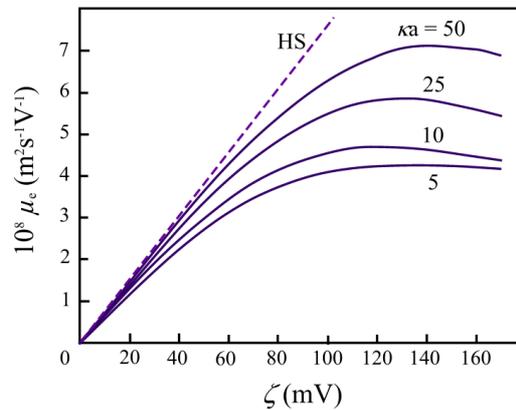
avec  $\eta$  la viscosité du milieu. Henry développa par la suite une expression analytique valable pour des valeurs intermédiaires de  $\kappa a$ , à condition que le potentiel- $\zeta$  reste inférieur à 40 mV environ [7]. Cette équation, dite de Henry, est définie par:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_o \varepsilon_r \zeta}{\eta} f(\kappa a). \quad (1.10)$$

Celle-ci fait apparaître une fonction  $f(\kappa a)$  permettant de prendre en compte les effets de retardement électrophorétique.  $f(\kappa a)$  est définie de telle sorte que pour  $\kappa a \rightarrow \infty$ ,  $f(\kappa a)$  se rapproche de l'unité et l'équation (1.10) se réduit à l'équation HS (équation (1.8)). De même, dans le cas limite où  $\kappa a \rightarrow 0$ ,  $f(\kappa a)$  devient égale à 2/3 en accord avec la formule HO (équation (1.9)). Cependant, l'expression de  $f(\kappa a)$  donnée par Henry consiste en deux expressions distinctes, l'une strictement valable pour les faibles valeurs de  $\kappa a$ , et l'autre à l'inverse applicable pour les forts  $\kappa a$ . Ohshima dérivait des années plus tard une expression unique mimant les variations de  $f(\kappa a)$  prédites initialement par Henry [10].

En considérant la déformation de la DCE depuis son état d'équilibre comme une légère perturbation, O'Brien et White améliorèrent une précédente théorie proposée par Wiersema *et al.* [11] et développèrent un formalisme numérique pour la détermination de la mobilité applicable pour des valeurs arbitraires à la fois de potentiel- $\zeta$  et de  $\kappa a$  [6]. Les variations de  $\mu_e$  en fonction du potentiel- $\zeta$  d'après la théorie de O'Brien et White sont illustrées dans la Figure 1.2. Les résultats témoignent du domaine d'application de la théorie HS. En effet pour des potentiels  $\zeta > 40-50$  mV et  $\kappa a < 50$ , la mobilité électrophorétique déterminée selon le modèle d'O'Brien et White ne suit plus l'équation (1.8) et demeure inférieure aux valeurs prédites par HS. De plus,  $\mu_e$  augmente avec le potentiel- $\zeta$  jusqu'à une valeur critique à partir de laquelle les variations de  $\mu_e$  atteignent un plateau et même un maximum pour  $\kappa a \gg 1$ . Cette réduction de la mobilité est liée au déplacement des contre-ions dans la DCE, sous l'effet du champ appliqué, dans le sens contraire du déplacement de la particule. Ce déplacement crée une séparation de charges et, par conséquent, un dipôle qui génère un champ électrique dirigé dans le sens contraire du champ appliqué. Ce champ électrique contrebalance les effets du champ appliqué et tend à décélérer la particule. Ainsi, pour les faibles potentiels-  $\zeta$  ( $\zeta < 40$  mV), peu de contre-ions sont présents dans la DCE et la contribution du champ induit par leur déplacement sur les variations de la mobilité sont

négligeables. Mais, lorsque le potentiel- $\zeta$  augmente ( $\zeta > 100$  mV), la quantité de contre-ions dans la DCE et la magnitude du champ induit augmentent également avec pour résultat une diminution (ou l'apparition d'un plateau) de la mobilité.



**Figure 1.2.** Mobilité électrophorétique  $\mu_e$  en fonction du potentiel- $\zeta$  pour différentes valeurs de  $\kappa a$  d'après la théorie de O'Brien et White [6] et comparaison avec l'expression analytique de Helmholtz Smoluchowski (HS) valable pour  $\zeta \leq 50$  mV et  $\kappa a \gg 1$  (d'après Delgado *et al.* [7]).

Ce modèle élaboré en 1978, est toujours considéré comme une référence. Ainsi, de nombreuses expressions analytiques tentant de reproduire ces résultats numériques furent développées (voir le récapitulatif de Ohshima *et al.* [12]). Il fut aussi étendu aux particules conductrices [13] et aux sphéroïdes [14-15] pour lesquelles les résultats préalables de De Keizer *et al.* [16] furent intégrés. Ohshima s'en inspira également pour son analyse du comportement électrophorétique de suspensions concentrées de particules molles (voir les détails dans §1.4.2) [17]. Il compléta ainsi son analyse théorique [18], strictement valable dans le cas de suspensions de particules rigides, obtenue en conciliant les modèles préalables de Levine et Neale [19], et Kozak et Davis [20-21]. Par la suite, Lee *et al.* [22] inclurent dans leur analyse numérique la polarisation de la DCE avec la possibilité d'un recouvrement des DCE de particules voisines dans le cas de suspensions fortement concentrées.

### 1.2.2. Application pour l'étude des interactions interparticulaires et de la stabilité colloïdale: la théorie DLVO.

La connaissance des propriétés électrocinétiques de particules en suspension est primordiale pour l'étude des phénomènes d'agrégation entre particules dures ou, en d'autres termes, pour l'étude de la stabilité colloïdale. Une suspension colloïdale est dite stable lorsque

les particules qui la composent sont dispersées dans la solution et résistent à l'agrégation. La stabilité colloïdale est gouvernée par la balance entre forces répulsives et attractives entre particules. En milieu polaire, elle peut être prédite par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) [23-24] combinant les effets dus au recouvrement des DCEs, également appelés interactions de doubles couches, et interactions attractives de van der Waals. Dans la prochaine section (§1.2.3), nous nous intéresserons brièvement aux interactions entre surfaces chargées au-delà de la théorie DLVO.

#### 1.2.2.1. Interactions électrostatiques répulsives de doubles couches.

Dans une suspension colloïdale, deux particules identiques de même charge et séparées par une distance  $r$  sont soumises à des forces répulsives électrostatiques. Lorsque le fond ionique est composé d'un électrolyte symétrique  $z : z$ , de concentration  $c^* = n^*/N_A$  (avec  $n^*$  la densité en ions), l'énergie de répulsion  $V_R(r)$  associée est définie par la relation

$$V_R(r) = 64\pi k_B T n^* a \kappa^{-2} \tanh^2\left(\frac{ze\Psi_d}{4k_B T}\right) e^{-\kappa r}. \quad (1.11)$$

Dans la limite de faibles potentiels tels que  $ze\Psi_d/k_B T < 1$ , l'équation (1.11) se réduit simplement à :

$$V_R(r) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a (\Psi_d)^2 e^{-\kappa r} \approx 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a \zeta^2 e^{-\kappa r}. \quad (1.12)$$

Les équations (1.11) et (1.12) montrent le rôle prédominant de deux paramètres : l'épaisseur de la double couche  $\kappa^{-1}$  et le potentiel- $\zeta$ . Le potentiel de répulsion entre deux particules suit une décroissance exponentielle en  $e^{-\kappa r}$ . Ainsi, l'augmentation de la concentration en ions dans la solution génère un meilleur écrantage de la charge de surface. Il en résulte une réduction du potentiel- $\zeta$  et donc un affaiblissement de la répulsion entre particules. De plus l'épaisseur des doubles couches électriques autour des particules diminue. L'étendue des forces de répulsion entre les doubles couches est alors amoindrie.

#### 1.2.2.2. Interactions de van der Waals.

Les forces de van der Waals sont des forces attractives résultant d'interactions atomiques et moléculaires de nature dipolaire. En d'autres termes, elles naissent des fluctuations des nuages électroniques autour de noyaux générant des dipôles. Les interactions de van der

Waals sont universelles et sont donc impliquées dans chaque phénomène d'interaction. Trois contributions sont mises en jeu :

- (i) *les forces de Keesom* liées aux interactions dipôle permanent – dipôle permanent responsables de la réorientation des dipôles qui tentent à s'aligner.
- (ii) *les forces de Debye* dues aux interactions dipôle permanent – dipôle induit. Le dipôle d'une molécule polarise la molécule voisine.
- (iii) *les forces de London* générées par les interactions dipôle induit – dipôle induit et qui constituent la plus forte contribution aux interactions de van der Waals.

La résultante de ces trois forces est une attraction entre deux particules. L'énergie potentielle d'attraction  $V_A(r)$  correspondante s'exprime par la relation :

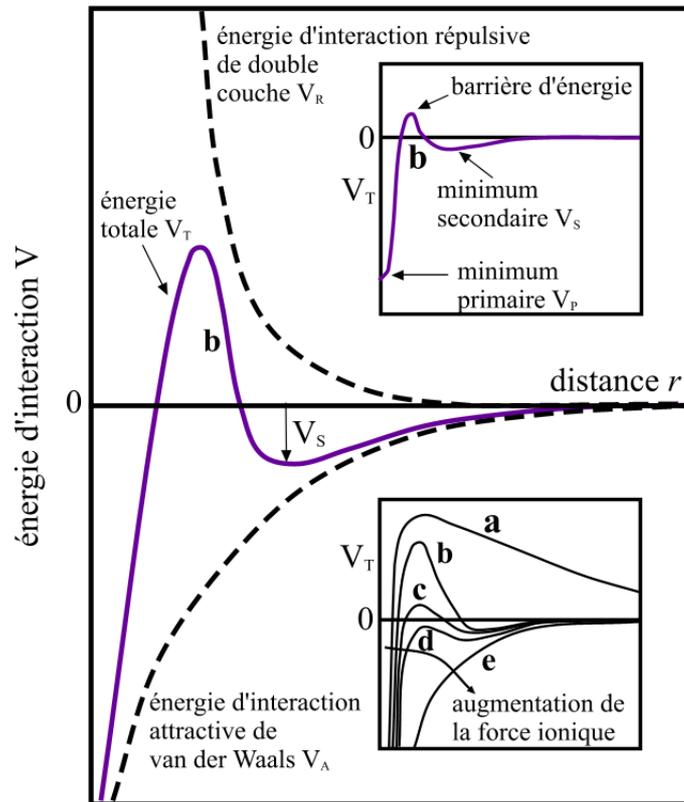
$$V_A(r) = -\frac{Aa}{12r}, \quad (1.13)$$

où  $A$  est la constante de Hamaker (J) qui dépend des propriétés diélectriques des particules en interaction et du solvant. Contrairement aux forces électrostatiques, les forces de van der Waals ne dépendent que de la géométrie des particules et de la composition de la suspension. De plus, la dépendance en  $1/r$  de la relation (1.13) montre que les interactions de van der Waals sont très importantes lorsque les particules se rapprochent.

#### 1.2.2.3. *Energie totale d'interaction.*

La théorie DLVO décrit les interactions interparticulaires en prenant en compte les contributions attractives de van der Waals avec les contributions répulsives de double couche. Les conditions de stabilité/instabilité sont définies par une courbe énergie – distance dont le profil dépend de la somme des potentiels attractifs et répulsifs (Figure 1.3).

Les forces de van der Waals étant indépendantes de la force ionique du milieu et de la charge des particules, l'évolution du profil d'énergie potentielle totale depuis la courbe a vers la courbe e est la conséquence d'une diminution de la portée et de la magnitude des forces de répulsions. Lorsque la charge de la particule est élevée et/ou la concentration en ions du milieu est faible (forts potentiels- $\zeta$ ), l'énergie liée aux répulsions électrostatiques est très importante et génère une barrière d'énergie, supérieure à l'énergie associée à l'agitation thermique, empêchant l'agrégation entre particules. Celles-ci restent isolées et la suspension



**Figure 1.3.** Représentation de l'énergie d'interaction  $V_T$  entre deux particules d'après la théorie DLVO en fonction de la distance interparticulaire (d'après Israelachvili)[25]. Courbe a : les particules se repoussent, la dispersion est stable. Courbes b à d : les particules se placent au minimum d'énergie secondaire et commencent à s'agréger. Courbe e : les particules s'agrègent rapidement

est stable (courbe a). Lorsque la concentration en électrolyte augmente, un minimum secondaire de potentiel, noté  $V_s$ , apparaît alors que la barrière d'énergie diminue. Tant que la barrière d'énergie reste supérieure à l'énergie d'agitation thermique, les particules se placeront dans le minimum secondaire ou resteront dispersées (courbes b et c). Dans le cas contraire, les particules commencent à s'agréger (courbe d). Enfin, lorsque la force ionique est très élevée, la charge de surface des particules est écrantée et l'épaisseur de leurs doubles couches diminue. Le potentiel- $\zeta$  devient très faible et la portée et la magnitude des forces électrostatiques répulsives diminuent. Les forces de van der Waals dominent alors l'interaction totale, les particules s'agrègent rapidement et la suspension colloïdale est instable (courbe e).

### 1.2.3. Limites de la théorie DLVO : vers une analyse dynamique des phénomènes électrocinétiques et d'interaction.

La théorie DLVO constitue une base pour l'étude de la stabilité colloïdale. Des forces supplémentaires dites non DLVO peuvent également intervenir lors de l'agrégation entre particules. Parmi elle, on trouve les forces de solvation, *i.e.* les forces attractives hydrophobes et les forces répulsives d'hydratation. Cette dernière repose sur le fait que, dans les milieux aqueux, les espèces ioniques libres sont entourées d'une sphère d'hydratation formée de molécules d'eau qui sont, pour rappel, des molécules polaires. La présence de molécules d'eau polaires autour des ions libres masque en partie la charge des ions. Par conséquent, plus l'ion est hydraté, plus sa charge effective diminue. Les ions les plus hydratés sont donc moins efficaces pour écranter la charge de la surface et les potentiels électrostatiques à l'interface surface/solution sont plus importants. Dans ce cas, la suspension colloïdale est stable contrairement aux prédictions de la théorie DLVO. Les forces attractives hydrophobes interviennent si les deux particules en interaction sont hydrophobes, c'est-à-dire si les particules possèdent une affinité réduite avec le milieu aqueux. L'approche de deux d'entre elles provoque une expulsion de l'eau les séparant et entraîne finalement l'agrégation des particules. A ces forces, nous pouvons ajouter les forces répulsives stériques qui interviennent si les surfaces en interaction sont recouvertes de chaînes polymériques. Leur encombrement, généré lors de l'approche des surfaces, empêche une approche suffisante pour que les interactions attractives de van der Waals entrent en jeu et les particules restent dispersées dans le milieu. Notons que d'autres facteurs peuvent également être intégrés dans cette théorie, *e.g.* rugosité de surface ou les interactions acide-base de Lewis.

L'utilisation de la théorie DLVO pour l'étude des interactions entre surfaces chargées implique que les DCEs formées aux interfaces surface/solution sont complètement relaxées durant l'approche des surfaces en interaction, c'est-à-dire que les propriétés physico-chimiques des DCEs sont à l'équilibre thermodynamique durant l'intégralité de l'interaction entre les deux surfaces.

Cependant, lors de l'interaction entre deux particules chargées, le recouvrement de leurs DCEs respectives implique des variations de potentiel électrostatique local dans les DCEs. Ces perturbations électriques génèrent une réorganisation des distributions spatiales des concentrations en ions dans le nuage ionique autour des particules selon divers processus dits

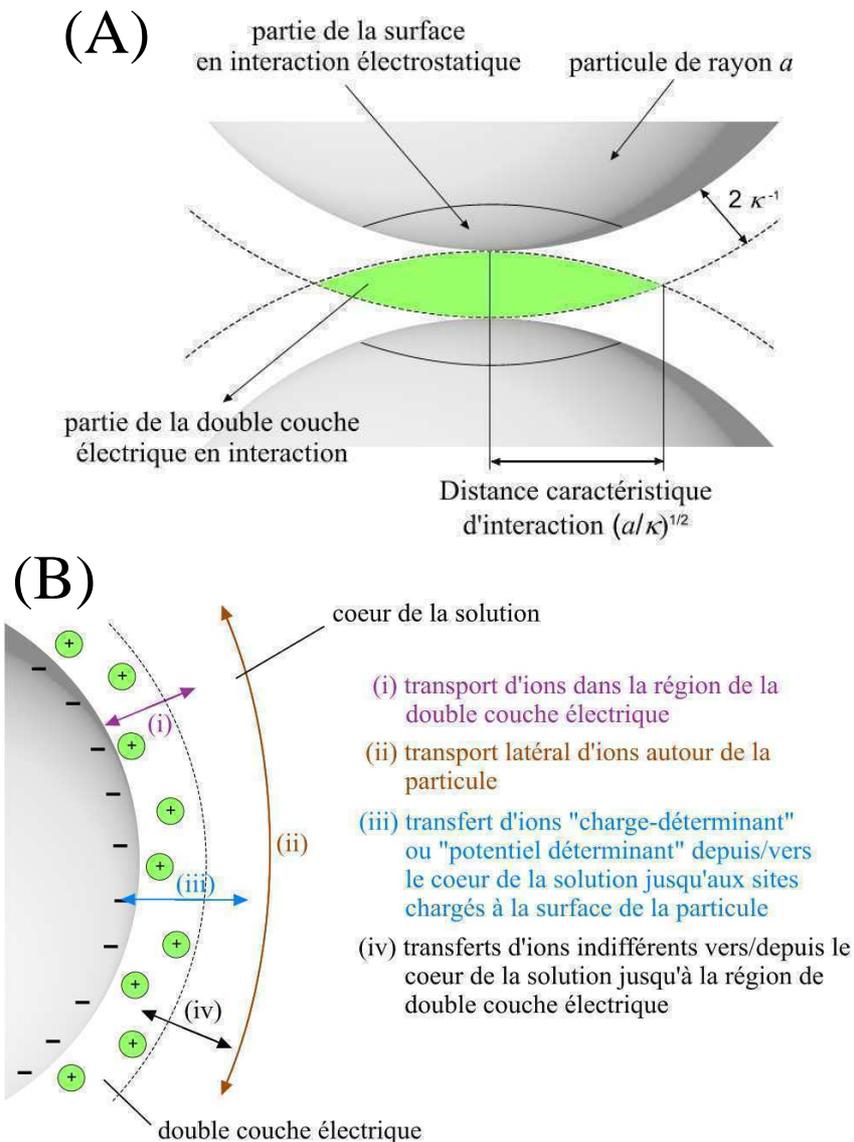
de relaxation que nous identifierons plus tard dans le texte. Les nuages ioniques ne sont donc plus à l'équilibre pendant l'interaction des deux particules. Les nombres de Deborah, définies par  $De_i = \tau_r^i / \tau_{int}$ , permettent de comparer le temps caractéristique d'interaction électrostatique  $\tau_{int}$  entre deux particules avec le temps caractéristique  $\tau_r^i$  du processus  $i$  gouvernant la relaxation des nuages ioniques vers un état d'équilibre. Pour illustration, le temps caractéristique  $\tau_{int}$  est défini, de manière simplifiée, comme le temps de diffusion de deux particules sphériques de coefficient de diffusion  $D_p$  sur la distance de recouvrement des DCEs des particules en interaction (pour illustration, voir la Figure 1.4A) avec :

$$\tau_{int} = \frac{\kappa^{-2}}{2D_p}. \quad (1.14)$$

Pour des particules dont le rayon varie entre 1nm et 1 $\mu$ m plongées dans une solution électrolytique de force ionique comprise entre 1mM et 100 mM, le temps d'interaction électrostatique est estimé à  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  secondes.

Pendant l'interaction entre particules, les nuages ioniques autour des particules sont perturbés électriquement. Les processus gouvernant la relaxation de ces nuages ioniques et leurs temps caractéristiques associés sont les suivants (Figure 1.4B) [26]:

- (i) *Transport des ions par diffusion-conduction dans les DCEs.* Le temps caractéristique associé  $\tau_r^{(i)}$  correspond au temps nécessaire pour des ions de coefficient de diffusion  $D$  pour traverser la DCE d'épaisseur  $1/\kappa$  avec  $\tau_r^{(i)} \approx 1/(\kappa^2 D)$ . Pour des forces ioniques comprises entre 1 et 100 mM, il vient  $\tau_r^{(i)} \approx 10^{-9}$ - $10^{-6}$  s.
- (ii) *Transport latéral des ions autour de la particule.* Le temps de relaxation associé  $\tau_r^{(ii)} \approx a^2/D$  est défini comme le temps de diffusion des ions sur une distance de l'ordre du rayon  $a$  de la particule. Pour un rayon  $a$  compris entre 1nm et 1 $\mu$ m, nous obtenons  $\tau_r^{(ii)} \approx 10^{-9}$ - $10^{-3}$  s.



**Figure 1.4.** (A) Représentation de l'interaction électrostatique entre deux particule. (B) Représentation des différents processus de relaxation à l'interface surface chargée/solution.

- (iii) Transfert d'ions charge (ou potentiel)-déterminants depuis/vers le cœur de la solution jusqu'aux sites chargés à la surface des particules. Ces processus déterminent la régulation des charges et potentiels électrostatiques à la surface des particules pendant leur interaction. Ces régulation de charge font intervenir le transport et la fixation/libération des espèces ioniques dites charge (ou potentiel)-déterminant, comme les protons/hydroxyles pour une particule oxyde dont la charge a pour origine la protonation ou la déprotonation des sites de

surface. Le temps caractéristique  $\tau_r^{(iii)}$  associé au transport par diffusion d'ions « charge-déterminant » est de l'ordre de la ms.

- (iv) *Transfert d'ions indifférents depuis/vers le cœur de la solution jusqu'à la région de DCE.* La perturbation des distributions de concentration au sein de la DCE provoque des perturbations de concentration ionique à l'extérieur de la DCE. Des ions indifférents vont diffuser depuis/vers le cœur de la solution. Le temps caractéristique associé  $\tau_r^{(iv)}$  est fonction d'une impédance, connue sous le nom d'impédance de Warburg, qui reflète une résistance au transfert massique.

Comme indiqué précédemment, la théorie DLVO repose sur l'évaluation des interactions électrostatiques entre deux surfaces chargées lorsque leurs DCEs respectives sont à l'équilibre thermodynamique durant l'intégralité de l'interaction. De telles conditions impliquent que l'ensemble des nombres de Deborah vérifie  $De_i = \tau_r^i / \tau_{int} \ll 1$ . Cependant, l'examen des temps caractéristiques  $\tau_r^i$  démontre que, pour un ou plusieurs processus, le nombre de Deborah associé ne satisfait pas la condition  $De_i = \tau_r^i / \tau_{int} \ll 1$  ce qui implique que les interfaces des deux colloïdes en interaction ne sont pas complètement relaxées durant l'interaction. Pour le cas de colloïdes de rayon  $\approx 1-10$  nm, l'épaisseur de la DCE ( $1/\kappa$ ) et les longueurs de diffusion des ions sont toutes du même ordre de grandeur dans des conditions pratiques de salinité (1-100 mM). Dans ce cas, l'interaction électrostatique entre ces deux colloïdes est dynamique par nature, c'est-à-dire qu'elle est couplée aux processus gouvernant la dynamique de l'interface surface/solution, appelée également électrodynamique.

Cette analyse prouve l'importance d'intégrer la dynamique des interfaces que forment les surfaces chargées avec leur milieu environnant pour l'analyse de l'interaction entre particules mais également pour l'étude des interactions particules – surfaces planes rencontrées, par exemple, dans le cadre des premiers stades de colonisation d'une surface par des microorganismes.

La dynamique d'interfaces colloïdales est également impliquée dans d'autres phénomènes d'interface. En particulier, dans certaines situations, la spéciation de métaux à la surface de particules colloïdales ne peut être séparée de ces processus de relaxation. Ce point spécifique sera détaillé dans le § 1.4.5 de ce chapitre.

L'étude de la dynamique d'interfaces colloïdales, ou encore l'étude de la dynamique de double couche électrique, constitue une part importante de ce travail de thèse. Depuis quelques décennies, le développement de méthodes électrocinétiques en champ alternatif a rendu possible l'analyse des processus de relaxation de double couche. La prochaine section s'intéresse donc aux différents mécanismes successifs mis en jeu dans la polarisation de la double couche et leur impact sur les quantités expérimentalement mesurées, *i.e.* la mobilité dynamique et la permittivité diélectrique.

### 1.3. Dynamique de double couche électrique de particules colloïdales.

#### 1.3.1. Processus de polarisation de la double couche électrique et temps caractéristiques associés.

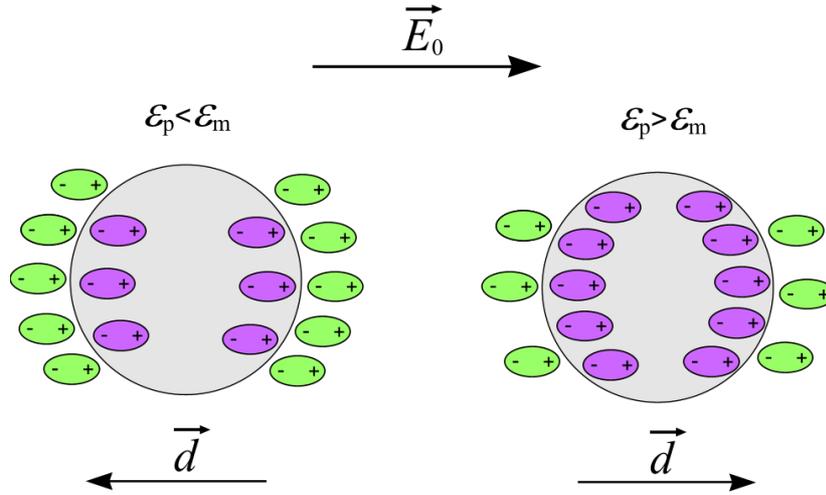
Une particule, initialement à l'équilibre thermodynamique, est stimulée électriquement par un champ électrique  $\vec{E}_0$ . Il en résulte une perturbation des distributions de potentiel électrostatique et de concentration en ions autour de la particule. Le terme de perturbation du potentiel local  $\psi(r, \theta)$  associé est donné par [27]:

$$\psi(r, \theta) = -E_0 r \cos \theta + \frac{d}{4\pi\epsilon_0\epsilon_m r^2} \cos \theta. \quad (1.15)$$

$d$  représente le module du moment dipolaire induit  $\vec{d}$  et  $\theta$  est l'angle formé entre le champ  $\vec{E}_0$  et le vecteur de position radiale  $\vec{r}$ . Le moment dipolaire peut s'exprimer en fonction du coefficient dipolaire  $C$  comme suit :

$$\vec{d} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_m a^3 C \vec{E}_0. \quad (1.16)$$

$C$  reflète l'impact des différents processus intervenant dans la polarisation de la DCE. C'est pourquoi l'étude de son évolution au cours du temps est judicieuse pour leur compréhension. Le premier de ces processus intervient immédiatement après application du champ. Les nuages électroniques à la fois dans la particule et dans le liquide se polarisent formant des dipôles électriques (voir Figure 1.5).



**Figure 1.5.** Représentation schématique des dipôles électriques formés à l'interface solide/liquide (d'après Shilov et al.[27]).

Ce processus étant plus rapide que le transport des espèces ioniques, le moment dipolaire associé n'est fonction que de la disparité entre permittivité du milieu  $\epsilon_m$  et de la particule  $\epsilon_p$  tel que [27-28]

$$C_{\text{perm}} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m}. \quad (1.17)$$

Sous l'augmentation du temps d'investigation  $t$ , les contre-ions, qui composent majoritairement la DCE, disposent d'un temps nécessaire pour migrer à travers la DCE. Ce processus, appelé relaxation de Maxwell-Wagner-O'Konski (MWO), intervient à des temps de l'ordre du temps de relaxation MWO, dénoté  $\tau_{\text{MWO}}$ , défini par [29-31] :

$$\tau_{\text{MWO}} = \frac{(\epsilon_p + 2\epsilon_m)\epsilon_o}{2K_m + K_p + 2K^\sigma/a}, \quad (1.18)$$

où  $K_m$  et  $K_p$  sont les conductivités du milieu de dispersion et de la particule et  $K^\sigma$  est la conductivité de la surface. La conductivité  $K^\sigma$  a été introduite par O'Konski dans l'expression originale du temps de Maxwell-Wagner (MW) notée  $\tau_{\text{MW}}$  et qui s'écrit [29-30]:

$$\tau_{\text{MW}} = \frac{(\epsilon_p + 2\epsilon_m)\epsilon_o}{2K_m + K_p}. \quad (1.19)$$

L'introduction du terme  $2K^\sigma/a$  dans l'équation (1.18) reflète que, bien que la particule soit non-conductrice, la présence d'une DCE autour de la particule engendre une conductivité effective localisée à la surface de la particule [31].

Pour une particule non-conductrice et portant une faible conductivité de surface ( $K_p = 0$  et  $K^\sigma = 0$ ), le temps de Maxwell-Wagner  $\tau_{MW}$  est comparable au temps de relaxation de l'électrolyte seul  $\tau_{m,cond}$ , tel que :

$$\tau_{MW} \sim \tau_{m,cond} = \frac{\epsilon_o \epsilon_m}{K_m}. \quad (1.20)$$

L'excès de charge locale créé lors de la migration des contre-ions dans la DCE est opposé par la diffusion de ses mêmes ions.  $\tau_{m,cond}$  peut donc être confondu avec le temps caractéristique associé à la diffusion des ions dans la DCE ( $\tau_{m,diff}$ ) [8], *i.e.* le temps nécessaire aux cations (anions) de coefficient de diffusion  $D_+$  ( $D_-$ ) pour parcourir une distance  $\kappa^{-1}$ . Il vient :

$$\tau_{MW} \sim \frac{\epsilon_o \epsilon_m}{K_m} = \frac{\kappa^{-2}}{D_+ + D_-}. \quad (1.21)$$

Considérons une particule conductrice, pour des temps suffisamment longs tels que  $t > \tau_{MWO}$ , l'amplitude du coefficient dipolaire  $C$  est désormais régie par les différences entre conductivités, il vient [27] :

$$C_{MWO} = \frac{K_p - K_m + 2K^\sigma/a}{K_p + 2K_m + 2K^\sigma/a}. \quad (1.22)$$

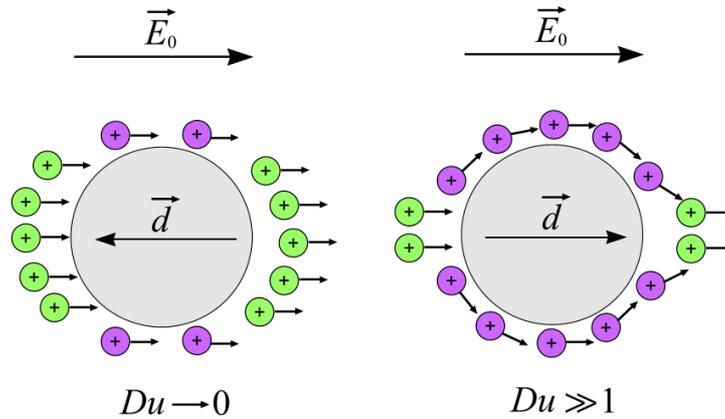
Dans le cas d'une particule non-conductrice ( $K_p = 0$ ), le coefficient dipolaire est seulement gouvernée par le nombre de Dukhin ( $Du = K^\sigma/K_m a$ ) [8]. L'équation (1.22) devient [28]

$$(K_p = 0) \quad C_{MWO} = \frac{2Du - 1}{2Du + 2}. \quad (1.23)$$

Pour les cas limites de très faibles et très fortes conductivités de surface ( $Du \rightarrow 0$  et  $Du \gg 1$ ), le coefficient dipolaire  $C_{MWO}$  se réduit simplement à :

$$(K_p = 0) \quad C_{MWO} = \begin{cases} -\frac{1}{2} & Du \rightarrow 0 \\ 1 & Du \gg 1. \end{cases} \quad (1.24)$$

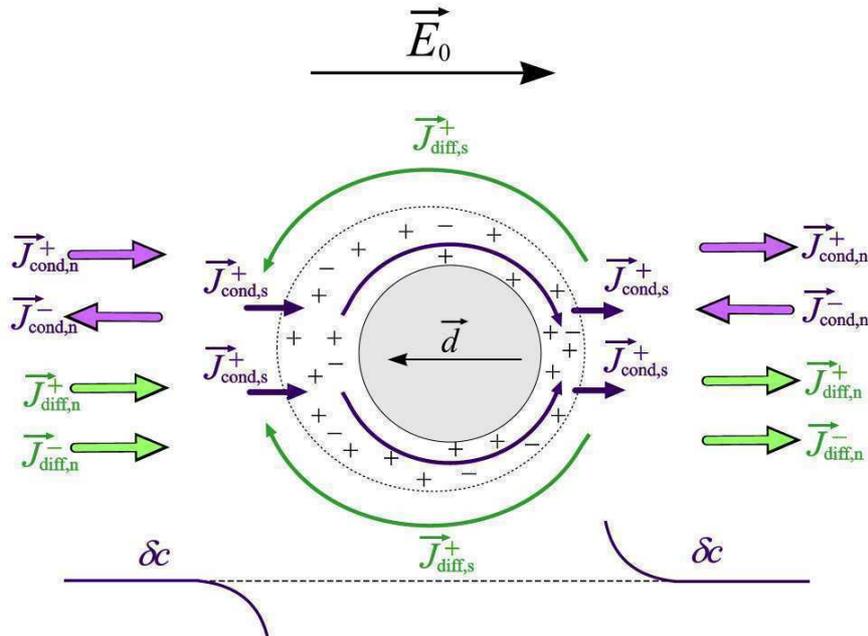
Cette propriété est illustrée dans la Figure 1.6 où la particule sphérique est considérée comme chargée négativement.



**Figure 1.6.** Représentation schématique des flux de migration dans la DCE pour de faibles (gauche) et grandes (droite) conductivités de surface. En vert : flux normaux ; en violet : flux tangentiels (d'après Shilov et al.[27]).

La Figure 1.6 montre que pour  $Du \rightarrow 0$  la surface de la particule est non-conductrice et le moment dipolaire est essentiellement dû aux flux normaux des contre-ions dans la DCE. Par conséquent, il y a accumulation de cations du côté gauche de la particule et déplétion de l'autre côté. Le moment dipolaire est donc orienté dans le sens contraire du champ  $\vec{E}_0$  en accord avec une valeur négative de  $C_{MWO}$  (voir équation (1.16)). Pour  $Du \gg 1$ , les flux d'ions tangents à la surface contribuent principalement à la formation de  $\vec{d}$ , la charge positive s'accumule du côté droit de la particule. Il en résulte un moment dipolaire  $\vec{d}$  orienté dans le même sens que  $\vec{E}_0$ . Cette caractéristique est confirmée par un coefficient  $C_{MWO}$  positif.

Le dernier processus impliqué dans la polarisation de la DCE est appelé relaxation  $\alpha$ . Il résulte de la différence de transport des ions à l'intérieur et à l'extérieur de la DCE. Dans la DCE, le mouvement des ions est principalement dû aux contre-ions, présents en majorité par rapport aux coions, dont le transport est en parti gouverné par le potentiel électrostatique local. A l'inverse dans le milieu ionique, caractérisé par un potentiel nul, à la fois contre-ions et coions participent au déplacement des charges [28]. Afin d'illustrer ce phénomène, considérons une particule chargée négativement (Figure 1.7).



**Figure 1.7.** Illustration de l'établissement d'une polarisation de concentration autour d'une particule chargée négativement. La présence d'un champ électrique produit des flux de contre-ions le long de la DCE ( $\vec{J}_{\text{cond},s}^+$ ) créant une accumulation de contre-ions à la droite de la particule. Cette concentration d'ions rencontre alors les flux de co-ions provenant de la solution ( $\vec{J}_{\text{cond},n}^-$ ) et donne lieu à une accumulation d'électrolyte neutre à la droite de la particule. Des phénomènes opposés se produisent de l'autre côté créant une déplétion d'électrolyte neutre. Le gradient de concentration, ou polarisation de concentration, génère des flux diffusifs le long de la surface ( $\vec{J}_{\text{diff},s}^+$ ) et dans la solution électrolytique ( $\vec{J}_{\text{diff},n}^+$ ,  $\vec{J}_{\text{diff},n}^-$ ) (d'après Grosse et al.[32]).

Après un temps  $t \gg \tau_{\text{MWO}}$ , les co-ions provenant de la solution, migrent dans le sens contraire du champ, *i.e.* de la droite vers la gauche (voir le flux  $\vec{J}_{\text{cond},n}^-$  dans la Figure 1.7). Ainsi à la droite de la particule, les co-ions rencontrent les contre-ions accumulés dans la DCE ( $\vec{J}_{\text{cond},s}^+$  dans la figure 1.7). Un excès d'électrolyte neutre  $\delta c$  est créé à la droite de la particule alors qu'une déplétion d'électrolyte est créée à sa gauche où les co-ions s'éloignent de la particule et migrent depuis son voisinage vers le cœur de la solution. Les contre-ions quant à eux, migrent le long de la surface et quittent le côté gauche de la particule créant un défaut d'électrolyte (Figure 1.7). La formation d'un tel gradient de concentration est communément appelée polarisation de concentration. Le système atteint par la suite un état stationnaire où le flux de migration des co-ions depuis la solution vers la DCE est contrebalancé par des flux de diffusion d'électrolyte neutre ( $\vec{J}_{\text{diff},n}^+$  et  $\vec{J}_{\text{diff},n}^-$ ) afin de rétablir l'équilibre avec le cœur de la solution. Tandis que dans la DCE, les flux transportant les

contre-ions à la frontière externe de la DCE sont égaux aux flux de contre-ions quittant cette frontière. Le temps nécessaire pour l'établissement de cet état stationnaire est donné par :

$$\tau_{\alpha} = \frac{a^2}{2D_{\text{eff}}}, \quad (1.25)$$

où  $D_{\text{eff}}$  est le coefficient de diffusion effectif défini comme suit :

$$D_{\text{eff}} = \frac{2D_+D_-}{D_+ + D_-}. \quad (1.26)$$

En d'autres termes,  $\tau_{\alpha}$  représente le temps requis pour la diffusion des ions le long d'une distance de l'ordre du rayon de la particule.

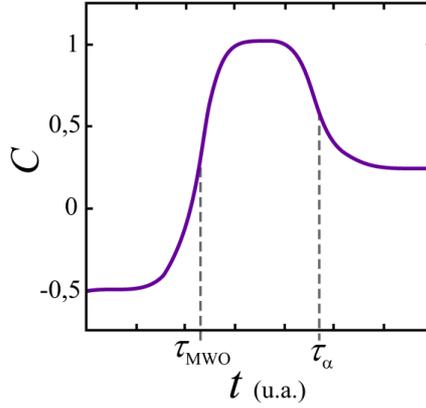
Pour des temps  $t > \tau_{\alpha}$ , un nouveau moment dipolaire apparaît, réduisant la force de  $C_{\text{MWO}}$ . Deux phénomènes en sont la cause. Premièrement, l'épaisseur de la DCE étant intrinsèquement liée à la force ionique de la solution, une augmentation de la concentration à la droite de la particule engendre une compression de la DCE et un rapprochement des contre-ions le long de la surface. Du côté opposé de la particule, les contre-ions sont répartis sur une plus large distance. Le centre des charges portées par le nuage électrolyte est alors déplacé vers la gauche donnant naissance à un moment dipolaire orienté dans le sens contraire de  $\vec{E}_0$  (voir la Figure 1.7 pour illustration). Deuxièmement, l'accumulation de charges positives du côté droit de la particule implique une réorganisation dans la distribution des contre-ions à l'intérieur de la DCE avec l'apparition de flux diffusifs le long de la surface ( $\vec{J}_{\text{diff},s}^+$ ) de la droite vers la gauche de la particule. Ces flux vont à l'encontre des flux de migration dans la DCE avec pour résultat un amoindrissement de la polarisation MWO.

Quantitativement, cette nouvelle contribution se caractérise par l'ajout d'un terme dénoté  $C_{\alpha}$  à l'expression définissant  $C_{\text{MWO}}$ . Ainsi, pour une particule non conductrice ( $K_p = 0$ ) et sous la condition  $\kappa a \gg 1$ ,  $C_{\alpha}$  est donné par [33]

$$(K_p = 0) \quad C_{\alpha} = -\frac{3}{2} \frac{Du^2}{(2Du+1)(Du+1)}. \quad (1.27)$$

Les variations du coefficient dipolaire  $C$  avec le temps  $t$  depuis application du champ  $\vec{E}_0$  jusqu'à l'établissement d'un état stationnaire (pour des temps  $t > \tau_{\alpha}$ ), se résument à un

enchaînement de plateaux délimités par des zones de transition lorsque le temps  $t$  se rapproche des temps caractéristiques  $\tau_{\text{MWO}}$  et  $\tau_{\alpha}$ . La Figure 1.8 en est l'illustration.



**Figure 1.8.** Evolution du coefficient dipolaire  $C$  avec le temps  $t$  suite à l'application d'un champ électrique telle que  $\tau_{\text{MWO}} \ll \tau_{\alpha}$ . La particule est non conductrice ( $K_p = 0$ ) avec  $\varepsilon_p \ll \varepsilon_m$  et  $Du \gg 1$ .

Elle représente les variations de  $C(t)$  pour une particule non-conductrice ( $K_p = 0$ ), définie par un nombre de Dukhin  $Du \gg 1$ , dont la permittivité est très faible devant celle de la solution ionique  $\varepsilon_p \ll \varepsilon_m$ . Cette situation est la plus représentative des précédentes analyses théoriques et expérimentales portant sur l'étude de suspensions de particules colloïdales. Les magnitudes de  $C$  aux plateaux dans le cas de particules non conductrices sont données par les équations (1.17), (1.23) et (1.27) avec :

$$(K_p = 0) \quad C = \begin{cases} C_{\text{perm}} = \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} & t \ll \tau_{\text{MWO}} \\ C_{\text{MWO}} = \frac{2Du - 1}{2Du + 2} & \tau_{\text{MWO}} \ll t \ll \tau_{\alpha} \\ C_{\text{MWO}} + C_{\alpha} = \frac{2Du - 1}{2Du + 2} - \frac{3}{2} \frac{Du^2}{(2Du + 1)(Du + 1)} & t \gg \tau_{\alpha} \end{cases} \quad (1.28)$$

En parfaite analogie avec cette étude, les variations du coefficient dipolaire  $C$  peuvent être déterminées dans le domaine des fréquences. Pour cela, la suspension colloïdale est soumise à un champ alternatif de pulsation  $\omega$  (voir §1.3.2) et les variations de  $C(\omega)$  (ou d'autres paramètres liés à  $C(\omega)$ ) sont déterminées en fonction de  $\omega$ . La fréquence du champ  $\omega$  constitue donc une sonde temporelle pour l'examen des processus de polarisation de DCE.

Différents phénomènes électrocinétiques permettent d'évaluer  $C(\omega)$  (ou d'autres paramètres associés). Parmi eux figurent [1] :

- (i) *La dispersion diélectrique, i.e.* les variations de permittivité diélectrique en fonction de la pulsation du champ appliqué, est déterminée par la polarisation de double couche électrique, en particulier par l'établissement d'une polarisation de concentration autour de la particule colloïdale. L'acquisition de tels spectres diélectriques est obtenue *via* l'utilisation de la spectroscopie de relaxation diélectrique (DRS en référence à sa dénomination anglaise Dielectric Relaxation Spectroscopy).
- (ii) *L'électroacoustique*, basée sur la création d'une onde de pression, ou onde acoustique, dans une suspension colloïdale soumise à un champ électrique alternatif (ESA pour Electrokinetic Sonic Amplitude) ou par l'acquisition d'un potentiel électrique induit par la propagation forcée d'une onde de pression dans la suspension (CVP pour Colloid Vibration Potential). L'utilisation de ces techniques, dénommées électrophorèse dynamique dans ce manuscrit, permet la détermination de la mobilité dynamique  $\mu_e^*(\omega)$  équivalent dynamique de la mobilité électrophorétique  $\mu_e$ .
- (iii) *L'électrorotation* qui repose sur la mise en rotation de particules colloïdales sous l'action d'un champ rotatif. La vitesse angulaire des particules est alors mesurée. Cette technique permet l'évaluation de la partie imaginaire du moment dipolaire induit.
- (iv) *La diélectrophorèse* qui consiste en l'application d'un champ alternatif non homogène générant une migration des particules vers/à l'écart des zones de plus haut potentiel selon la polarisation de la particule.
- (v) *La biréfringence électrique* basée sur la rotation de particules anisotropiques soumises à un champ électrique impliquant une modification de leur indice de réfraction en fonction de la fréquence d'oscillation du champ et reflétant ainsi la polarisabilité de la particule.

L'association de ces techniques avec l'étude des suspensions colloïdales dans le domaine statique, c'est-à-dire pour des temps  $t$  très longs ( $t \gg \tau_\alpha$ ) ou des fréquences  $\omega$  très faibles

( $\omega \ll 1/\tau_\alpha$ ), permet une description de l'interface particule/solution (*e.g.* charge, distribution de potentiel, polarisation) couvrant une large gamme fréquentielle depuis la perturbation électrique jusqu'à l'établissement d'un régime stable.

### 1.3.2. Techniques électrocinétiques en champ alternatif.

Parmi les techniques citées dans le précédent paragraphe, ce travail de thèse s'intéresse à deux d'entre elles : l'électrophorèse dynamique et la DRS. Dans cette section nous nous limiterons à une description des méthodes et paramètres mis en jeu et nous présenterons les équations de base de ces deux techniques.

Ces techniques reposent sur une perturbation électrique dépendante en fréquence de suspensions de particules chargées. Dans le cas de particules dures, l'application d'un champ électrique alternatif  $\vec{E}_0(\omega t) = \vec{E}_0 \exp(j\omega t)$  (avec  $j^2 = -1$ ), génère une perturbation des distributions de concentrations en ions et de potentiel électrostatique à l'interface surface/solution selon les processus décrits dans le §1.3.1. Un moment dipolaire est alors créé, celui-ci étant caractérisé par un coefficient dipolaire complexe  $C^*(\omega)$  dépendant de  $\omega$  et qui peut être réécrit sous la forme :

$$C^*(\omega) = C'(\omega) - jC''(\omega), \quad (1.29)$$

où  $C'(\omega)$  et  $C''(\omega)$  sont les parties réelles et imaginaires (au signe près) de  $C^*(\omega)$  qui constitue l'équivalent fréquentielle du coefficient dipolaire  $C(t)$ . L'évolution de  $C^*(\omega)$  gouverne les variations, avec  $\omega$ , des deux grandeurs déterminées *via* l'électrophorèse dynamique et la DRS, *i.e.* la mobilité dynamique  $\mu_c^*(\omega)$  (équivalent dynamique de la mobilité électrophorétique) et la permittivité diélectrique  $\epsilon^*(\omega)$ .

#### 1.3.2.1. Electrophorèse dynamique.

Comme précédemment évoqué, l'électrophorèse dynamique est l'analogue dynamique de l'électrophorèse avec l'avantage de donner des informations sur les mécanismes de polarisation de la DCE et parfois même, lorsque les conditions sont favorables, sur le phénomène de polarisation de concentration.

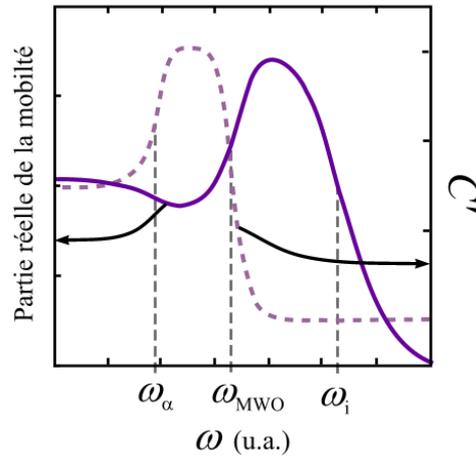
La mobilité dynamique  $\mu_e^*(\omega)$  est également une quantité complexe composée d'une partie réelle et d'une partie imaginaire. De plus elle est intrinsèquement liée au coefficient dipolaire  $C^*(\omega)$  par la relation [7, 34] :

$$\mu_e^*(\omega) = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_m \epsilon_o \zeta}{\eta} (1 - C^*(\omega)) G(\omega), \quad (1.30)$$

où  $G(\omega)$  est une fonction prenant compte des effets d'inertie subis par la particule dans le fluide à hautes fréquences (de l'ordre du GHz lorsque  $a = 100$  nm), elle est définie par :

$$G(\omega) = \frac{1 + (1-j)\sqrt{\beta/2}}{1 + (1-j)\sqrt{\beta/2} - j\frac{\beta}{9}\left(3 + 2\frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m}\right)}, \quad (1.31)$$

où le paramètre  $\beta$  est un paramètre sans dimension donné par  $\beta = \omega a^2 \rho_m / \eta$ . L'équation (1.30) montre que lorsque le coefficient dipolaire augmente, le moment dipolaire associé tend à décélérer le mouvement de la particule. Cette tendance est illustrée dans la figure 1.9 qui représente schématiquement la partie réelle de  $\mu_e^*$  en fonction de la pulsation du champ appliqué en comparaison avec les variations du coefficient dipolaire associé.



**Figure 1.9.** Illustration des variations de la partie réelle de la mobilité électrophorétique (ligne pleine) et du coefficient dipolaire réel associé (ligne pointillée) en fonction de la fréquence d'oscillation du champ  $\omega$

La figure montre également la présence de trois fréquences caractéristiques gouvernant l'établissement de l'état stationnaire atteint pour des fréquences  $\omega \rightarrow 0$  : les fréquences de relaxation  $\alpha$  et MWO définies par  $\omega_\alpha = \tau_\alpha^{-1}$  et  $\omega_{MWO} = \tau_{MWO}^{-1}$  respectivement, et une troisième

fréquence  $\omega_1$  liée aux effets d'inertie de la particule se déplaçant dans un fluide visqueux.  $\omega_1$  est donnée par:

$$\omega_1 = \frac{2\eta}{\rho_m a^2}. \quad (1.32)$$

Les différents processus mis en jeu et leurs fréquences caractéristiques respectives peuvent être résumés ainsi :

- (i)  $\omega \ll \omega_\alpha \ll \omega_{MWO} \ll \omega_1$ : le régime stationnaire, matérialisé par un plateau dans les variations de la mobilité, est atteint. Les fréquences sondées permettent l'établissement de la polarisation de concentration et de l'ensemble des flux de conduction et de migration associés. La double couche est alors totalement relaxée. Dans ce régime basse fréquence, la mobilité est équivalente à la mobilité électrophorétique usuelle avec  $\mu_e^*(\omega \rightarrow 0) = \mu_e$ .
- (ii)  $\omega \approx \omega_\alpha \ll \omega_{MWO} \ll \omega_1$ : les fréquences sondées se rapprochent de  $\omega_\alpha$ . Par conséquent la polarisation de concentration ne possède plus le temps nécessaire pour s'établir. La diffusion des ions, qui suivait le mouvement de la particule, cessent dans la DCE et à l'échelle de la particule avec pour conséquence une légère diminution de la mobilité électrophorétique.
- (iii)  $\omega_\alpha \ll \omega \approx \omega_{MWO} \ll \omega_1$ : la fréquence de sollicitation empêche la migration des contre-ions dans la DCE et donc l'établissement de la polarisation MWO atteinte pour des fréquences proches de  $\omega_{MWO}$ . Les flux de migration des contre-ions allant à l'encontre du déplacement de la particule, il en résulte une forte augmentation de la mobilité électrophorétique.
- (iv)  $\omega_\alpha \ll \omega_{MWO} \ll \omega \approx \omega_1$ : la fréquence du champ électrique est tellement élevée que la particule chargée cesse son déplacement. Il en résulte une chute de la mobilité qui intervient lorsque  $\omega$  est très grand devant  $\omega_1$ .

Nous pouvons noter que les variations de la mobilité dynamique sont très sensibles à la polarisation (ou relaxation) MWO avec l'apparition d'un maximum marqué à des fréquences  $\omega_{MWO} < \omega < \omega_1$ . A l'inverse la polarisation (ou relaxation)  $\alpha$  ne génère qu'une très faible variation de la mobilité qui peut dans de nombreux cas ne pas être visible.

O'Brien [35], Babchin *et al.* [36], Sawatsky et Babchin [37], et Fixman [38] furent les premiers à proposer des formules analytiques pour la détermination de la mobilité dynamique. Ces différents travaux furent par la suite comparés par James *et al.* [39]. Cependant, leurs analyses respectives souffrent de nombreuses restrictions et approximations sur la taille de la particule et la concentration du milieu (larges  $\kappa a$ ), le potentiel- $\zeta$  ou encore sur les fréquences de sollicitations  $\omega$ , limitant fortement le nombre de systèmes colloïdaux pouvant être étudiés. En 1992, Mangelsdorf et White [40] obtinrent l'ensemble des équations électrocinétiques gouvernant l'électrophorèse dynamique de particules sphériques rigides et les résolurent numériquement. Cette analyse valable pour toutes les fréquences, tailles de particules, concentrations en électrolyte et potentiel- $\zeta$  constitue la référence de nombreux travaux ultérieurs. Des travaux expérimentaux ont montré une bonne corrélation entre théorie et expérience malgré une tendance de la théorie à surestimer la magnitude de la mobilité [41]. Les équations électrocinétiques furent ensuite résolues analytiquement dans la limite de faibles potentiels- $\zeta$  par ses mêmes auteurs [42] suivis de Ohshima [43]. Ennis et White [44-45] examinèrent par la suite les effets de conduction dans la couche de Stern en conciliant les travaux de Mangelsdorf et White traitant des effets de conduction en électrophorèse en champ continu [13] et ceux portant sur le comportement dynamique de la mobilité électrophorétique [40]. Le cas des particules sphéroïdales ou cylindriques fut également traité par Loewenberg et coauteur [46-47] et ensuite par Ohshima [48].

De plus, les techniques électroacoustiques sont probablement les seules à permettre une étude des propriétés électrocinétiques de suspensions hautement concentrées en particules dont les fractions volumiques peuvent atteindre 40 à 50%. Ainsi, il existe trois approches différentes pour la détermination de  $\mu_e^*(\omega)$  dans des suspensions concentrées. La première est basée sur l'introduction d'une correction semi-empirique sur le potentiel- $\zeta$  [49]. O'Brien et coauteurs [50-51] suivirent une différente approche en évaluant l'impact sur la mobilité dynamique des interactions particule-particule. Enfin, la suspension colloïdale concentrée peut théoriquement être divisée en plusieurs sphères ou cellules modèles, comme celles décrites par Kuwabara [52], englobant une particule entourée du milieu externe. Cette méthode, portée essentiellement par Dukhin, Ohshima et coauteurs [53-55], est la plus suivie notamment en raison de son traitement similaire au cas des suspensions diluées à l'exception de l'introduction de conditions aux limites supplémentaires à la surface de la cellule modèle [56-58].

1.3.2.2. *Spectroscopie de Relaxation Diélectrique.*

La Spectroscopie de Relaxation Diélectrique (ou DRS) permet l'évaluation de la permittivité diélectrique  $\varepsilon^*(\omega)$  sur une large gamme de fréquence  $\omega$ .  $\varepsilon^*(\omega)$  est également une quantité complexe généralement définie sous la somme de deux termes :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega). \quad (1.33)$$

$\varepsilon'(\omega)$ , la partie réelle de la permittivité, représente le stockage de l'énergie du champ appliqué et reflète à l'échelle macroscopique la polarisation de la particule.  $\varepsilon''(\omega)$ , la partie imaginaire au signe près, est communément appelée « perte diélectrique », elle représente la conversion de l'énergie sous forme de chaleur. La connaissance d'une seule de ces deux quantités est nécessaire pour l'étude de la réponse diélectrique de systèmes chargés. En effet,  $\varepsilon'(\omega)$  et  $\varepsilon''(\omega)$  sont des fonctions conjuguées qui satisfont les relations de Kramers-Kronig [8, 59]:

$$\begin{aligned} \Delta\varepsilon'(\omega) = \varepsilon'(\omega) - \varepsilon_m &= -\frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\varepsilon''(\omega') \omega' d\omega'}{\omega'^2 - \omega^2}, \\ \varepsilon''(\omega) &= \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{[\varepsilon'(\omega') - \varepsilon_m] \omega' d\omega'}{\omega'^2 - \omega^2}. \end{aligned} \quad (1.34)$$

L'équation (1.34) fait apparaître le terme  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  communément appelé « incrément diélectrique » qui peut être analysé en lieu et place de  $\varepsilon'(\omega)$ . Une dernière quantité est également utile pour l'étude de la dispersion diélectrique. Il s'agit de la conductivité complexe  $K^*(\omega)$  reliée à la permittivité diélectrique par la relation :

$$K^*(\omega) = K_{DC} + j\omega\varepsilon_0\varepsilon^*(\omega), \quad (1.35)$$

où  $K_{DC}$  est la conductivité à très basses fréquences, *i.e.* à  $\omega \rightarrow 0$ , et tient compte de la contribution des ions dans la solution, dans la DCE mais également de la mobilité des particules [32].  $K^*(\omega)$  peut également être exprimé en fonction du coefficient dipolaire complexe  $C^*(\omega)$  selon la relation:

$$K^*(\omega) = K_m^*(\omega) \frac{(1+2\phi)K_p^*(\omega) + 2(1-\phi)K_m^*(\omega)}{(1-\phi)K_p^*(\omega) + (2+\phi)K_m^*(\omega)} = K_m^*(\omega) \frac{1+2\phi C^*(\omega)}{1-\phi C^*(\omega)}, \quad (1.36)$$

où nous avons utilisé la relation suivante qui est simplement l'analogie complexe de l'équation (1.22) :

$$C^*(\omega) = \frac{K_p^*(\omega) - K_m^*(\omega)}{K_p^*(\omega) + 2K_m^*(\omega)}. \quad (1.37)$$

$K_m^*(\omega)$  et  $K_p^*(\omega)$  sont les conductivités complexes du milieu et de la particule respectivement et  $\phi$  est la fraction volumique en particules dans la suspension.  $K_m^*(\omega)$  est lié à la permittivité du milieu selon :

$$K_m^*(\omega) = K_m + j\omega\varepsilon_0\varepsilon_m, \quad (1.38)$$

avec  $K_m$  la conductivité dans le milieu à basses fréquences. Dans la limite de suspensions très diluées, *i.e.* pour de faibles  $\phi$ ,  $K^*(\omega)$  devient linéairement dépendant de  $\phi$  et  $C^*(\omega)$  et l'équation (1.36) se réduit à [60]:

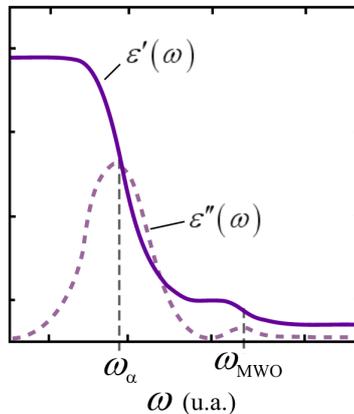
$$K^*(\omega) = K_m^*(1 + 3\phi C^*(\omega)). \quad (1.39)$$

En combinant les équations (1.29), (1.33), (1.35), (1.38) et (1.39) avec la relation  $K_{DC} = K^*(\omega \rightarrow 0) = K_m(1 + 3\phi C'(\omega \rightarrow 0))$ , il est possible d'exprimer la permittivité réelle et imaginaire en fonction de  $C^*(\omega)$ , il vient alors:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_m(1 + 3\phi C'(\omega)) - \frac{3\phi K_m C''(\omega)}{\varepsilon_0 \omega}, \quad (1.40)$$

$$\varepsilon''(\omega) = 3\varepsilon_m \phi C''(\omega) + \frac{3\phi K_m}{\varepsilon_0 \omega} (C'(\omega) - C'(\omega \rightarrow 0)). \quad (1.41)$$

Les variations typiques de  $\varepsilon'(\omega)$  et  $\varepsilon''(\omega)$  sont illustrées dans la figure ci-dessous et mettent en relief les fréquences de relaxation  $\omega_\alpha$  et  $\omega_{MWO}$ .



**Figure 1.10.** Illustration des variations de la permittivité diélectrique réelle (ligne pleine) et imaginaire (ligne pointillée) en fonction de la fréquence d'oscillation du champ  $\omega$

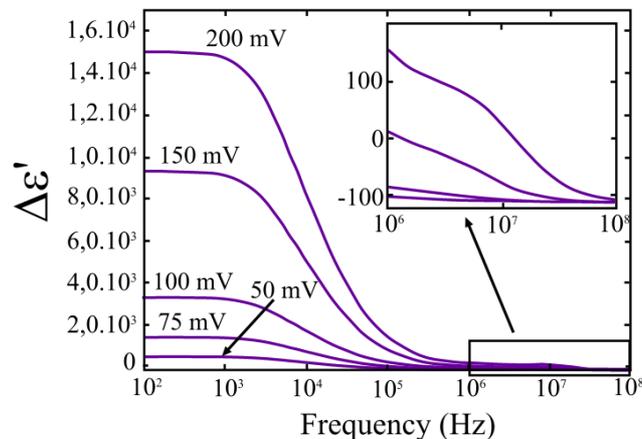
Elles peuvent être résumées ainsi :

- (i)  $\omega \ll \omega_\alpha \ll \omega_{MWO}$  : la double couche est complètement relaxée. La signature de l'établissement de la polarisation de concentration et des flux de diffusion autour de la particule se traduit par une forte permittivité réelle. A l'inverse, la perte diélectrique est nulle puisque dans cette gamme de fréquence la double couche électrique peut suivre aisément les oscillations du champ appliqué et aucune énergie n'est donc dissipée.
- (ii)  $\omega \approx \omega_\alpha \ll \omega_{MWO}$  : les fréquences sondées ne permettent plus l'établissement de la polarisation de concentration. Par conséquent la permittivité réelle chute fortement puis se stabilise pour des fréquences  $\omega_\alpha \ll \omega \ll \omega_{MWO}$ . Quant à la permittivité imaginaire, celle-ci augmente jusqu'à atteindre un maximum pour des fréquences  $\omega = \omega_\alpha$ . En effet le nuage ionique autour de la particule ne peut plus suivre les oscillations du champ et n'est donc plus en phase avec ces variations. De l'énergie est donc dissipée avec un maximum à  $\omega = \omega_\alpha$ .
- (iii)  $\omega_\alpha \ll \omega \approx \omega_{MWO}$  : la fréquence de sollicitation empêche la migration des contre-ions dans la DCE et donc l'établissement de la polarisation MWO avec pour conséquence une légère diminution de la permittivité réelle. De plus la perte diélectrique atteint un maximum secondaire pour  $\omega = \omega_{MWO}$ .
- (iv)  $\omega_\alpha \ll \omega_{MWO} \ll \omega$  : les contre-ions dans la DCE ne migrent plus, aucune énergie n'est donc dissipée ou encore stockée, la perte diélectrique devient nulle alors que la permittivité réelle se rapproche de  $\epsilon_m$ .

A l'inverse de l'électrophorèse dynamique, la DRS est plus sensible à la relaxation  $\alpha$  qui se traduit par l'apparition d'un haut plateau pour  $\omega \ll \omega_\alpha$  dans les variations de  $\epsilon'(\omega)$ , et par un maximum fortement marqué à  $\omega = \omega_\alpha$  dans l'évolution de  $\epsilon''(\omega)$ . La relaxation MWO n'est visible que lorsque la force de la polarisation  $\alpha$  diminue.

L'étude théorique de la réponse diélectrique de particules colloïdales soumises à un champ électrique alternatif fut l'objet de nombreux travaux durant les dernières décennies parallèlement à l'analyse de la mobilité dynamique [28, 31, 61-65] (voir la publication de

Grosse et Delgado [32] pour plus de détails). Cependant nombreux de ces modèles souffrent de restrictions sur le potentiel- $\zeta$ ,  $\kappa a$  ou encore sur la gamme de fréquence sondée. C'est en 1981 que DeLacey et White [66] reportèrent un formalisme théorique numérique valable pour toutes valeurs de potentiel- $\zeta$  et de  $\kappa a$ . Les auteurs se basèrent sur le travail préalable de O'Brien et White [6] valable dans le domaine statique et par conséquent négligèrent les termes d'inertie limitant leur théorie au domaine basse fréquence.



**Figure 1.11.** Incrément diélectrique, calculé suivant le formalisme de DeLacey et White [66], de suspensions de particules sphériques de rayon 200nm dispersées dans une solution de KCl à 1mM pour différents potentiels- $\zeta$ . Encart :Relaxation MWO (d'après Grosse et Delgado [32]).

Un exemple de spectres diélectriques, *i.e.* variations de l'incrément diélectrique en fonction de la pulsation  $\omega$ , obtenus en utilisant le formalisme proposé par DeLacey et White [66] est représenté dans la Figure 1.11. Premièrement, celle-ci met en exergue les deux fréquences caractéristiques  $\omega_\alpha$  (à basses fréquences) et  $\omega_{\text{MWO}}$  (à hautes fréquences) avec une prédominance évidente de la relaxation  $\alpha$ . Deuxièmement, la figure témoigne de la nette dépendance de la magnitude de la permittivité avec le potentiel- $\zeta$ . En effet, plus la particule est chargée et plus la quantité de contre-ions dans la DCE augmente. Il en résulte une augmentation de l'amplitude de la polarisation MWO et surtout de la polarisation  $\alpha$ .

Par la suite, l'étude de DeLacey et White fut améliorée par Mangelsdorf et White [67] qui résolurent avec succès les équations fondamentales de l'électrocinétique pour tout  $\zeta$ ,  $\kappa a$  mais surtout sans restriction sur les gammes de fréquences considérées. Ces études bien que prometteuses sont malheureusement généralement incapables de prédire les résultats

expérimentaux en raison d'une tendance à sous-estimer la magnitude de la permittivité [68-70]. Cependant, ce problème peut être en partie corrigé en considérant une mobilité des ions due à la conduction dans la couche de Stern [71-73]. De plus, à l'instar des techniques électroacoustiques, la spectroscopie diélectrique permet l'étude de suspensions colloïdales concentrées d'où la nécessité de développer un formalisme valable pour de larges valeurs de  $\phi$ . A la suite d'une étude semi-empirique portée par Delgado *et al.*[74], Carrique *et al.*[75] puis Bradshaw-Hajek *et al.*[76-77] développèrent un formalisme numérique utilisant le modèle de cellule proposé par Kuwabara [52]. Enfin, le cas des particules sphéroïdales fut également l'objet d'études approfondies. Deux modèles furent ainsi élaborés par Grosse *et al.*[78] et ensuite par Chassagne *et al.*[79] Alors que le premier prédit deux fréquences de relaxations  $\alpha$  en référence au grand axe et au petit axe de la particule sphéroïdale, le second n'en montre qu'une seule. Les résultats de Grosse *et al.* furent validés expérimentalement écartant le modèle de Chassagne *et al.*[80-81].

#### **1.4. Limites de ces théories : le cas des interphases molles.**

Les milieux naturels sont principalement constitués de particules molles, *i.e.* perméables au flux de fluide, telles que les microorganismes (bactéries, virus), les acides humiques ou les polysaccharides. En particulier les bactéries présentent à la surface de leur paroi membranaire diverses structures, *e.g.* lipopolysaccharides (LPS), *pili* ou *fimbriae*, pouvant s'étendre dans le milieu externe sur quelques nanomètres jusqu'à plusieurs dizaines de microns, constituant ainsi une à plusieurs couches perméables. Cependant les formalismes théoriques précédemment cités échouent dans la prédiction des propriétés électrocinétiques aux interfaces molles, appelées également interphases, ou encore dans l'analyse de leur interactions avec des surfaces chargées. C'est pourquoi il est devenu indispensable de développer des modèles théoriques pour les particules perméables de type cœur/couronne (description dans le prochain paragraphe) qui incluent les cas limites de particules entièrement perméables (particules polyélectrolytes) et de particules dures [82].

##### **1.4.1. Description de l'interphase molle.**

D'après le modèle initié par Ohshima [83-85], une particule colloïdale molle sphérique et constituée d'un noyau dur et imperméable de rayon  $a$ , recouvert d'une couche de polyélectrolyte d'épaisseur  $d$ , perméable aux ions (Figure 1.12). Cette couche molle est

caractérisée par une distribution spatiale tridimensionnelle de groupement ionogéniques hydrodynamiquement stagnants contrairement aux particules dures où la charge est localisée à la surface de la particule.

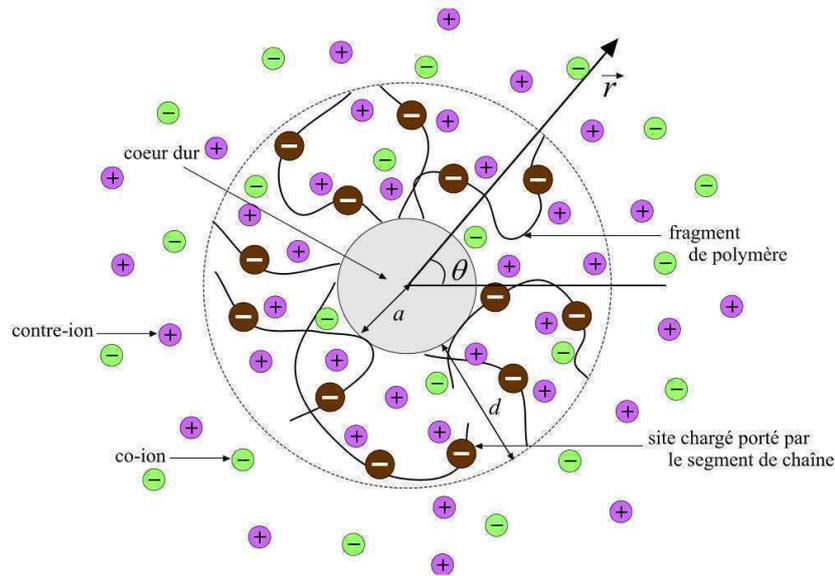


Figure 1.12. Représentation schématique d'une particule molle (d'après Duval et Ohshima [86]).

La perméabilité hydrodynamique de la couche molle est caractérisée par un paramètre de mollesse hydrodynamique  $\lambda$  homogène à l'inverse d'une distance.  $1/\lambda$  représente la distance de pénétration de flux hydrodynamique dans la couche de polyélectrolyte. Selon ce modèle, deux cas limites, représentées dans la figure 1.13, peuvent être considérées. En l'absence de couche polyélectrolyte, *i.e.*  $d = 0$ , la particule molle se comporte comme une particule rigide. A l'opposé, en l'absence de noyaux dur, *i.e.*  $a = 0$ , la particule est entièrement composée de chaînes polyélectrolytes et donc entièrement perméable.

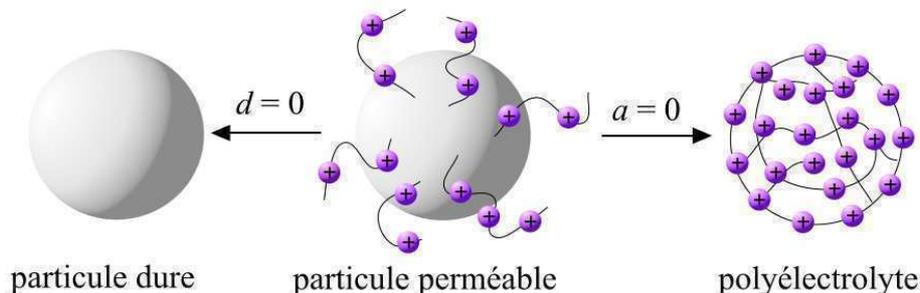
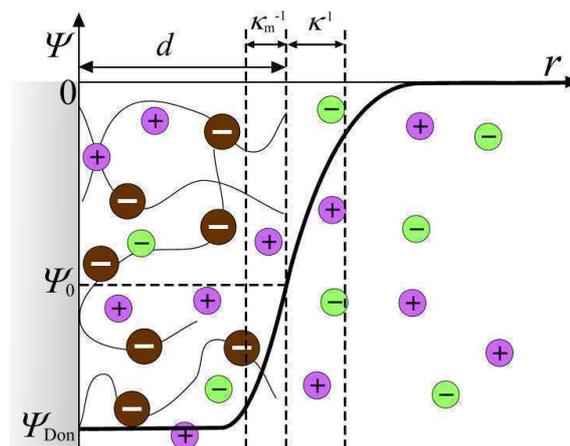


Figure 1.13. Une particule molle devient rigide en l'absence de couche polymérique alors qu'elle devient un polyélectrolyte sphérique en l'absence de cœur dur (d'après Ohshima [84-85]).

La couche polymérique étant perméable, les contre-ions, et dans une moindre mesure, les co-ions se répartissent à l'intérieur même de cette couche. Ainsi, à l'opposé des interfaces surface dure – solution, la double couche électrique s'étend non seulement vers la solution de cœur mais également à l'intérieur de la couche polymérique. De plus les épaisseurs typiques de la couche perméable sont du même ordre de grandeur, sinon plus grandes, que la distance de Debye modifiant la distribution de potentiel aux interphases molles. Le potentiel au cœur de cette couche est donné par le potentiel Donnan ( $\Psi_{\text{Don}}$ ) dès lors que l'épaisseur de la couche polymérique est très supérieure à la longueur de Debye, *i.e.* pour  $\kappa d \gg 1$  (voir la Figure 1.14). L'interphase ne peut donc plus être décrite par le modèle de Stern. De la même manière, il est impossible de situer un plan de cisaillement rendant la notion de potentiel- $\zeta$  erronée et physiquement inapplicable.



**Figure 1.14.** Représentation schématique de la distribution de potentiel à une interphase molle avec  $\kappa d \gg 1$  (d'après Ohshima [84-85]).

#### 1.4.2. Electrocinétique aux interphases molles.

Faisant suite à divers travaux théoriques élaborés dans les années 1980 [87-90], Ohshima apporta une grande contribution pour l'évaluation des propriétés électrophorétiques de particules molles [83-85]. L'ensemble de ces analyses adoptent le modèle de Debye et Bueche [91] et considèrent les segments polymériques comme étant des centres de résistance exerçant une force de friction sur le liquide s'écoulant dans la couche polymérique. L'évaluation de la mobilité est basée sur la résolution de l'équation de Poisson au travers de la couche de polymères et de l'équation de Navier-Stokes rendant compte du flux de fluide à l'intérieur et à

l'extérieur de la couche perméable. Pour un électrolyte symétrique  $z : z$ , l'expression de la mobilité électrophorétique obtenue par Ohshima et valable dans la limite où  $\lambda a \gg 1$ ,  $\kappa a \gg 1$ ,  $\lambda d \gg 1$  et  $\kappa d \gg 1$  est donnée par :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_o \varepsilon_r}{\eta} \frac{\Psi_0 / \kappa_m + \Psi_{\text{Don}} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} \left[ 1 + \frac{1}{2(1+d/a)^3} \right] + \frac{\rho_{\text{fix}}^0}{\eta \lambda^2}. \quad (1.42)$$

$\rho_{\text{fix}}^0$  est la densité de charges portées par les segments polymériques et  $\eta$  est la viscosité du milieu.  $\kappa_m$  représente l'inverse de la longueur de Debye dans la partie molle (épaisseur de double-couche intraparticulaire) avec :

$$\kappa_m = \kappa \left[ 1 + \left( \frac{\rho_{\text{fix}}^0}{2ze n^*} \right)^2 \right]^{1/4}. \quad (1.43)$$

Le potentiel Donnan  $\Psi_{\text{Don}}$ , atteint au cœur de la couche polyélectrolyte, et le potentiel à la frontière externe de la couche perméable  $\Psi_0$  ( $\Psi_0 = \Psi(r = a + d)$ ) sont donnés par :

$$\Psi_{\text{Don}} = \frac{k_B T}{ze} \ln \left[ \frac{\rho_{\text{fix}}^0}{2ze n^*} + \left\{ \left( \frac{\rho_{\text{fix}}^0}{2ze n^*} \right)^2 + 1 \right\}^{1/2} \right], \quad (1.44)$$

$$\Psi_0 = \Psi_{\text{Don}} + \frac{2k_B T n^*}{\rho_{\text{fix}}^0} \left[ 1 - \left\{ \left( \frac{\rho_{\text{fix}}^0}{2ze n^*} \right)^2 + 1 \right\}^{1/2} \right]. \quad (1.45)$$

L'équation (1.42) montre que la mobilité électrophorétique est fonction de la densité de charge  $\rho_{\text{fix}}^0$  et du paramètre  $\lambda$  à l'opposé des particules rigides dont les propriétés électrophorétiques dépendent du potentiel- $\zeta$ . De plus à larges forces ioniques, la mobilité  $\mu_e$  ne tend plus vers une valeur nulle mais atteint une valeur limite égale à  $\rho_{\text{fix}}^0 / \eta \lambda^2$ , signature électroosmotique de la présence d'une interphase perméable.

Les formalismes portés par Ohshima constituent une impressionnante avancée pour l'analyse des propriétés électrophorétiques de particules molles et présentent l'avantage de ne dépendre que de deux paramètres ajustables  $\rho_{\text{fix}}^0$  et  $\lambda$ . Cependant, celui-ci négligea les phénomènes de polarisation et relaxation de double couche responsables d'une chute de la mobilité électrophorétique pour les hauts potentiels (voir le cas des particules rigides illustré dans la Figure 1.2). Saville [92] prouva la nécessité d'intégrer ces effets de relaxation et par conséquent de développer des formalismes numériques rigoureux. C'est dans cette optique

que Hill *et al.* [93-94], Lopez Garcia *et al.* [95-96] et Duval et Ohshima [86] élaborèrent parallèlement des modèles numériques permettant l'évaluation des propriétés électrophorétiques couvrant une large gamme de force ionique, de charge de polyélectrolyte et d'épaisseur de couche perméable. Enfin, Ohshima dérivait récemment une expression analytique approximant ces effets de polarisation [97]. Ces études montrèrent que les variations de la mobilité électrophorétique de particules molles (portant les sites chargés dans leur couche perméable) vis-à-vis de leur homologue rigide (portant la même charge totale à leur surface) résultent de forces électrostatiques modulées par les forces de friction exercées par les segments polymères sur le fluide. Ainsi, dans le cas de polymères faiblement chargés, la particule molle est ralentie dû aux effets de friction. En revanche, si la densité de charge est importante et en particulier si la concentration en électrolyte est faible, les effets électrostatiques contrebalancent les effets hydrodynamiques et le déplacement de la particule est accéléré en comparaison avec une particule rigide.

Dans chacune de ces théories (à l'exception de Duval et Ohshima [86]) la densité de charges fixes  $\rho_{\text{fix}}(r)$  est supposée homogène. En d'autres termes  $\rho_{\text{fix}}(r)$  est constant dans la couche polymérique avant de chuter brusquement jusqu'à zéro à l'interface polyélectrolyte – solution :

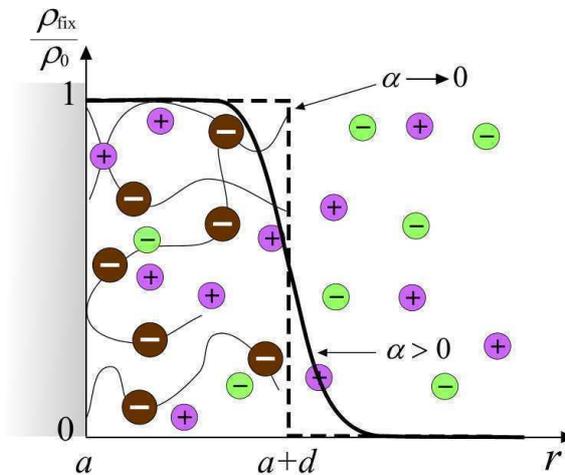
$$\begin{cases} \rho_{\text{fix}}(r) = \rho_{\text{fix}}^0 & \text{pour } a < r < a + d \\ \rho_{\text{fix}}(r) = 0 & \text{pour } r > a + d \end{cases} \quad (1.46)$$

Cependant, des particules telles que les polysaccharides [98], les particules microgel [99-100] ou les acides humiques [101] manifestent une distribution hétérogène ou diffuse des segments polymériques avec une décroissance de la densité depuis le cœur vers l'extérieur des particules. Dans le cas de (bio)particules comme les bactéries, celles-ci manifestent à la surface de leur membrane des structures chargées de différentes tailles donnant naissance à un gradient de densité de charge au sein de leur interphase.

Sur la base de précédents résultats portant sur l'électrocinétique de films polymères chargés et diffus par Duval et co-auteurs [102-103], il était nécessaire d'intégrer dans ces formalismes théoriques une distribution hétérogène, ou diffuse, des sites chargés impliquant une décroissance graduelle de la quantité de charge depuis la couche de polymère vers la solution électrolytique (Figure 1.15) avec [86, 104] :

$$\rho_{\text{fix}}(r) = \rho_{\text{fix}}^0 \frac{\chi}{2} \left\{ 1 - \tanh\left(\frac{r - (a + d)}{\alpha}\right) \right\}. \quad (1.47)$$

Dans de récents travaux pour l'analyse expérimentale et théorique, *via* la technique de potentiel/courant d'écoulement, des propriétés électrostatiques et hydrodynamiques de films polyélectrolytes minces mous et diffus [105-107], il a été montré que l'utilisation de la fonction tangente hyperbolique ( $\tanh$ ) dans l'équation (1.47) est réaliste pour la modélisation des interphases molles diffuses et pour reproduire leur gonflement lors d'un changement de conditions du milieu externe, *e.g.* force ionique et/ou pH. De plus, la fonction  $\tanh$  permet à elle seule de modéliser l'interphase molle depuis la surface dure (ou depuis le centre de la particule polyélectrolyte) jusqu'au cœur de la solution électrique et assure une décroissance continue de la densité de charge portée par les segments polymères autour de la position  $r = a + d$ . L'étendue de cette région de décroissance est ajustée *via* le paramètre  $\alpha$  qui a la dimension d'une longueur et qui reflète le degré d'inhomogénéité de la distribution de densité de charge.



**Figure 1.15.** Représentation schématique de l'interphase diffuse (adapté de Gaboriaud et al. [108]).

Lorsque  $\alpha \rightarrow 0$ , la situation limite de distribution homogène des sites chargés dans la couche perméable d'épaisseur  $d$ . Sous l'augmentation du paramètre  $\alpha$ , le caractère diffus de l'interface augmente et la distribution spatiale des sites chargés devient hétérogène avec une diminution continue de la densité de charge  $\rho_{\text{fix}}(r)$  depuis sa valeur au cœur de la couche molle  $\rho_{\text{fix}}^0$  (dans la limite  $\kappa d \gg 1$ ) jusqu'à atteindre une valeur nulle dans la solution

électrolyte. Dans cette situation, l'épaisseur de la couche molle n'est plus égale à  $d$ . A la place, la couche perméable s'étend sur une distance estimée à  $d(1+2,3\alpha/d)^*$  [86].

De plus l'ajustement du paramètre  $\alpha$  autorise un contrôle du gonflement et de la contraction de la couche molle observés lors d'un changement des conditions du milieu, *e.g.* de température, de force ionique et/ou de pH. Ces processus de gonflement/rétractation sont liés à la distribution de potentiel électrostatique à travers l'interphase diffuse. Par exemple, une diminution de la force ionique du milieu externe entraîne un écrantage moins efficace des charges portées par les chaînes polymériques en contact immédiat avec le milieu et donc une augmentation du potentiel électrostatique local. Les interactions électrostatiques répulsives entre ces chaînes vont entraîner leur déploiement vers le milieu externe et un gonflement de la couche polymérique. Ce gonflement peut être modélisé par une augmentation du rapport  $\alpha/d$  [105-107].

Finalement, l'équation (1.47) fait apparaître le paramètre  $\chi$  qui assure le maintien de la quantité totale de charge lorsque  $\alpha$  augmente.

En intégrant l'équation (1.47) dans leur formalisme théorique, Duval et Ohshima [86] ont mis en avant l'impact généré par une distribution hétérogène des segments de polymères sur la mobilité électrophorétique tout en incluant les effets de polarisation. De plus, ce modèle est valable quelle que soit la concentration du milieu de suspension, la charge et la taille des particules. L'existence d'une interphase diffuse peut engendrer une augmentation/diminution de la magnitude de la mobilité électrophorétique en comparaison avec une interphase compacte ( $\alpha \rightarrow 0$ ). La densité de segments polymériques étant plus importante dans la région sondée par les flux hydrodynamiques, la particule peut être soit ralentie pour des faibles potentiels électrostatiques en raison des forces de friction exercées par les segments polymères déployés dans la solution sur le fluide, soit, dans le cas contraire, accélérée lorsque l'augmentation de potentiel dans les régions pénétrées par le fluide compense l'action des forces de friction. L'utilisation de ce modèle se montre nécessaire et particulièrement pertinente pour l'évaluation des propriétés électrostatiques et hydrodynamiques de particules possédant une couche perméable unique, *e.g.* particules microgel gonflées/contractées [98], mais également dans le cas de particules composées d'une succession de couches perméables

---

\* A la position  $r = a + d(1+2,3\alpha/d)$ , la densité de segments polymère est estimée à 2% de sa valeur au cœur de la couche perméable

dont l'épaisseur de la couche externe est très grande devant la distance de pénétration des flux ( $\lambda_{\text{externe}} d_{\text{externe}} \gg 1$ ), e.g. bactéries gram-négatives enveloppées de LPS.

Toutefois, dans le cas de particules n'obéissant pas cette condition, c'est-à-dire lorsque les propriétés des couches internes sont susceptibles de contribuer dans la magnitude de la mobilité électrophorétique, il est fondamental de considérer la nature « multicouche » des particules dans le formalisme. Plus précisément par particule multicouche, on considère toute particule possédant (ou non) un cœur dur enveloppé de plusieurs couches perméables successives dont les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques diffèrent [109-110]. De ce fait, l'hétérogénéité est non seulement spatiale mais elle touche également la composition chimique et les propriétés hydrodynamiques des différentes couches. Des mesures électrophorétiques réalisées sur des bactériophages MS2 ont été interprétées sur ces bases [109]. Les bactériophages MS2 sont considérés comme des particules sphériques entièrement poreuses comportant trois couches molles de compositions différentes. Le centre de la particule est composé de l'ARN, enveloppé d'une deuxième couche d'ARN lié à la capsidie protéique qui forme la couche la plus externe. Les auteurs ont montré que la réponse électrocinétique est déterminée en grande partie par les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques des couches les plus internes en particulier à faibles forces ioniques où la double couche électrique se développe jusqu'au cœur de la particule. L'ajout de la nature multicouche des particules dans le formalisme numérique n'est toutefois pas nécessaire lorsque la couche la plus externe obéit la condition  $\lambda_{\text{externe}} d_{\text{externe}} \gg 1$ , c'est-à-dire lorsque les flux hydrodynamiques pénètrent seulement dans la couche externe et ne sont sensibles qu'aux potentiels électriques locaux générés par la densité de charge de cette couche uniquement. Ce cas particulier fut rencontré dans le cadre de mesures électrophorétiques réalisées sur des souches bactériennes *Streptococcus salivarius* présentant, ou non, des *fimbriae* à leur surface [110]. Les auteurs ont montré que dans le cas de la souche enveloppée de *fimbriae* composée de deux couches perméables, i.e. membrane cellulaire et *fimbriae*, la mobilité électrophorétique était exclusivement déterminée par les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques de la couche externe.

L'électrocinétique de particules colloïdales perméables soumises à un champ électrique alternatif fut également investie expérimentalement [111] et théoriquement, dans la limite d'une distribution homogène des segments polymères au sein d'une seule couche unique [112-114]. En particulier Ahualli *et al.* [114] développèrent un modèle théorique prédisant la

mobilité dynamique et la permittivité diélectrique de suspensions concentrées. A l'image de la mobilité électrophorétique, ces deux quantités sont dépendantes du couplage entre effets électrostatiques et effets hydrodynamiques et peuvent atteindre des magnitudes bien plus élevées que leur homologue rigide. Cette tendance fut par ailleurs confirmée expérimentalement sur des particules polyélectrolytes sphériques [111].

#### **1.4.3. Interactions électrostatiques entre interphases molles.**

Les interactions électrostatiques entre (bio)particules molles gouvernent en grande partie des phénomènes tels que l'adhésion de microorganismes sur une surface ou l'infection bactérienne. Ce n'est que récemment que des études théoriques, portées essentiellement par Ohshima, sont apparues afin de prédire ces interactions [115-117]. Ohshima a développé des expressions analytiques pour l'évaluation des interactions électrostatiques entre particules molles enveloppées d'une couche perméable unique portant des groupes ionogéniques complètement dissociés et distribués de façon homogène. Ces expressions ont été obtenues pour des particules dont la densité de charge dans la couche perméable autorise la linéarisation de l'équation de Poisson – Boltzmann (approximation de Debye-Hückel). De plus, elles sont applicables aux particules dont la taille permet l'utilisation de l'approximation de Derjaguin où l'énergie d'interaction électrostatique entre deux particules est obtenue à partir du calcul de l'énergie d'interaction par unité de surface entre deux surfaces planes parallèles correspondantes. L'utilisation des approximations de Debye-Hückel et de Derjaguin limite l'application des formalismes proposés par Ohshima aux interactions entre particules dont la taille est de l'ordre ou supérieur à quelques centaines de nm et dont la densité de charge dans la couche perméable est faible. Finalement, Ohshima a également dérivé une expression analytique pour les interactions électrostatiques entre deux particules sphériques polyélectrolytes (entièrement poreuses) dans la limite de faibles densités de charge [115].

#### **1.4.4. Détermination des propriétés mécaniques de particules molles : le cas des cellules microbiennes.**

Les techniques électrocinétiques permettent une description des propriétés de surface des interphases molles à travers la détermination de la densité de charge surfacique  $\rho_{\text{fix}}^0$ , de la mollesse hydrodynamique  $\lambda$  et du degré d'hétérogénéité  $\alpha$ . Cependant une telle description reste incomplète sans l'acquisition d'informations supplémentaires liées aux propriétés

structurelles des interphases. La Microscopie à Force Atomique (ou AFM selon son appellation anglaise Atomic Force Microscopy) se présente comme une méthode de choix puisqu'elle permet l'investigation des propriétés nanomécaniques de microorganismes en milieu aqueux à l'échelle nanométrique tout en préservant l'intégrité de leurs membranes et des appendices de surfaces les enveloppant [118-120]. Brièvement, l'AFM repose sur l'interaction entre une pointe, dite pointe AFM, et un échantillon à étudier. Cette interaction dépend non seulement de la distance entre la pointe et la surface mais également de leurs propriétés physico-chimiques respectives. L'AFM possède deux applications majeures. Premièrement elle permet l'acquisition d'images de l'échantillon donnant des informations sur la structure et la rugosité de la surface étudiée. De plus son utilisation en mode « spectroscopie de force » permet d'évaluer les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon. De cette étude peuvent être extraites les propriétés nanomécaniques de la surface, *i.e.* le module d'Young reflétant son élasticité, et sa constante de raideur lié à la pression de turgescence qui contrebalance la compression de l'échantillon par la pointe AFM [121]. Des informations supplémentaires sur le principe de l'AFM sont présentées dans le chapitre 5 §5.4.

L'AFM appliqué aux cellules vivantes connaît depuis quelques années un riche développement avec notamment la caractérisation des propriétés élastiques des cellules et de leur constante de raideur [108, 122-126], la localisation de sites de reconnaissance moléculaire [127-129], ou encore la mesure de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires [130-131]. Récemment, le couplage entre propriétés électrohydrodynamiques et propriétés nanomécaniques d'interfaces de deux bactéries gram-négatives *Shewanella* fut spécifiquement investi par Gaboriaud *et al.* [108] Les auteurs ont tout d'abord interprété la signature électrocinétique des suspensions bactériennes sur la base du modèle de Duval et Ohshima [86] relatif à l'étude du comportement électrophorétique de particules molles diffuses et adapté aux particules cylindriques. Encore une fois, cette étude prouve l'importance de définir une distribution hétérogène des segments polymériques en particulier à faible force ionique où un gonflement de la couche perméable autour de la bactérie est attendu. L'utilisation des paramètres extraits, *i.e.*  $\rho_{\text{fix}}^0$ ,  $\lambda$  et  $\alpha$ , a par ailleurs permis de prédire avec succès les forces d'interaction électrostatiques entre bactéries et pointe AFM. De cette manière les auteurs ont démontré la complémentarité des deux techniques

(électrocinétique/nanomécanique) et ont établi l'aptitude de l'électrocinétique à déterminer les forces d'interaction obtenues par AFM.

#### **1.4.5. Spéciation dynamique d'ions métalliques à des interphases molles.**

Le dernier point abordé dans le cadre de ce travail de thèse concerne la réactivité chimique d'ions métalliques aux interphases molles. Cette étude est motivée par la cohabitation dans les milieux naturels aqueux entre métaux lourds et particules ou films mous, *e.g.* microorganismes, acides humiques ou films organiques. Dans les systèmes non pollués les métaux sont présents dans des quantités trace et sont ainsi assimilés par des organismes afin de satisfaire des besoins physiologiques. Cependant l'activité humaine, qu'elle soit urbaine ou industrielle, a engendré une surconcentration de ces métaux dans l'environnement avec pour principaux émetteurs les secteurs de la chimie, du raffinage de métaux ou encore les utilisateurs de métaux qui enveloppent les secteurs liés à la tannerie (rejet de mercure), aux peintures (plomb, cadmium), à l'essence (plomb), aux textiles et pneumatiques (cadmium)... Les métaux vont alors s'accumuler et interagir avec les organismes présents dans ces systèmes pour donner naissance à une grande diversité de complexes métalliques dont les propriétés physicochimiques divergentes vont impacter leur réactivité, mobilité et biodisponibilité. De plus, les écosystèmes aquatiques sont la cible de nombreux changements de conditions et ne sont donc jamais à l'équilibre rendant la spéciation des ions métalliques dynamique par nature. La dynamique de spéciation est alors contrôlée par la cinétique de réaction chimique mais également par le transport des espèces métalliques vers/depuis les sites réactifs.

Par conséquent, des méthodes théoriques et expérimentales sont requises pour, d'une part, l'étude de la spéciation dynamique et de la bioaccumulation de métaux mais également afin de prédire leur biodisponibilité et évaluer les risques face à leur toxicité [132]. C'est dans ce contexte qu'ont émergées différentes techniques expérimentales telles que la DGT [132-133] (Diffusive Gradients in Thin films), la PLM [132, 134-135] (Permeation Liquid Membranes) et les techniques voltammétriques [132, 136-137], qui reposent sur les concepts de « couches de réaction » ou de labilité, la labilité étant définie comme l'aptitude d'un complexe à maintenir un équilibre avec l'ion métallique libre alors que celui-ci peut être consommé par une interface [132].

La réaction de complexation entre l'ion métallique libre M et un site réactif, ou ligand, L pour former le complexe métallique ML peut être définie par



où  $k_a$  et  $k_d$  sont les constantes de formation et de dissociation du complexe. La constante  $k_a$  est généralement en accord avec le mécanisme d'Eigen constitué de deux étapes successives pour la complexation d'un cation métallique hydraté  $M(H_2O)_n$  par un ligand L. La première étape consiste en la formation transitoire d'un complexe métal-ligand dit de sphère externe  $M(H_2O)_nL$ . La constante de stabilité d'une telle réaction, notée  $K_{os}$ , est déterminée par les interactions électrostatiques entre le ligand et le métal hydraté. Cette étape est suivie par la substitution d'une molécule d'eau de la sphère de coordination interne de  $M(H_2O)_n$  par le ligand L pour former le complexe  $ML(H_2O)_{n-1}$ . La constante de réaction associée est dénotée  $k_{-H_2O}$ . D'après le mécanisme d'Eigen, la constante de formation est définie par  $k_a = K_{os} k_{-H_2O}$ . En général, la formation initiale du complexe de sphère externe ( $K_{os}$ ) est une étape rapide alors que l'expulsion d'une molécule d'eau de la sphère de coordination interne ( $k_{-H_2O}$ ) est l'étape limitante qui détermine la vitesse de formation du complexe métallique. Les valeurs de  $k_{-H_2O}$  sont disponibles dans la littérature pour divers cations métalliques et ligands [138].

Dans l'hypothèse où le nombre de ligand est en excès devant la quantité d'ions métalliques, les temps de vie des espèces métalliques M et ML sont égaux à  $1/k_a c_L = 1/k'_a$  et  $1/k_d$  respectivement (où  $c_L$  est la concentration en ligands). De cette manière deux situations limites peuvent être définies. Premièrement, le système est dit statique et le complexe métallique est considéré comme inerte sur une gamme de temps  $t$  si les temps de vie de M et ML sont très grands comparés à  $t$ . En d'autres termes,  $k'_a$  et  $k_d$  satisfont la condition [132, 139]

$$k'_a t, k_d t \ll 1. \quad (1.49)$$

Dans le cas limite inverse, c'est à dire lorsque  $k'_a$  et  $k_d$  obéissent la condition

$$k'_a t, k_d t \gg 1, \quad (1.50)$$

les temps de vie de M et ML sont faibles devant le temps d'expérimentation  $t$  et le complexe ML est dit dynamique.

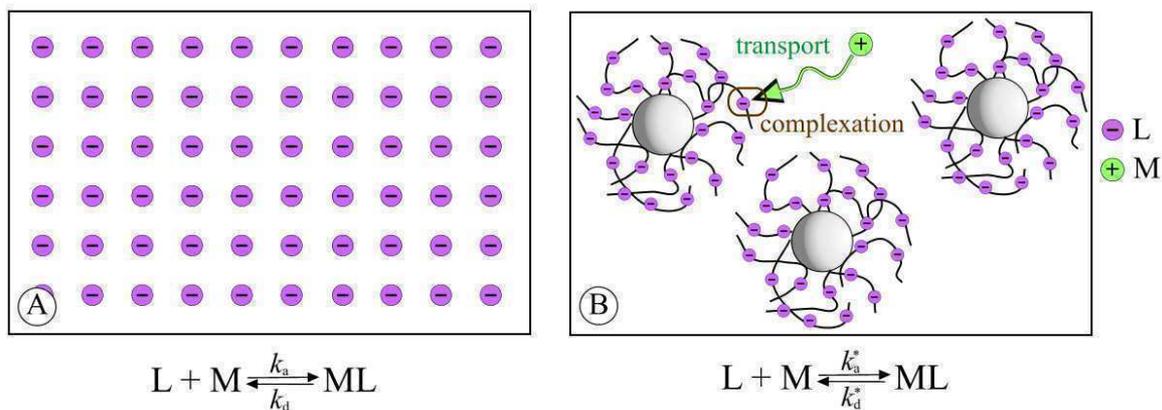
Considérons la situation d'un complexe ML dynamique. Le flux de métal M vers une interface consommatrice d'ions est déterminé par la diffusion et l'interconversion chimique des espèces métalliques. Le critère de labilité  $\mathcal{L}$  est défini par le rapport  $J_{\text{cin}}/J_{\text{diff}}$ , *i.e.* le rapport entre le flux de métal généré par la dissociation de ML ( $J_{\text{cin}}$ ) et le flux contrôlé par la diffusion de ML et de M ( $J_{\text{diff}}$ ) [139]. Si le flux de métal est exclusivement contrôlé par les flux de diffusion, le complexe ML est dit « entièrement labile » avec  $\mathcal{L} \gg 1$ . Dans le cas contraire, *i.e.* lorsque  $\mathcal{L} \ll 1$ , le flux de métal est déterminé par la cinétique de réaction et le complexe ML est « non-labile ».

Cependant, dans certains cas, la théorie échoue dans l'explication des résultats expérimentaux. A titre d'exemple, Botelho *et al.* [140-141] rapportèrent dans leur analyse de la complexation du cuivre et du plomb dans des eaux de rivières que les complexes métalliques issus de l'interaction avec des particules couvertes de matière organique sont inertes, alors que les complexes ayant réagi avec cette même matière organique désorbée sont labiles. Une telle disparité entre théorie et expérience provient de l'utilisation seule des constantes  $k'_a$  et  $k_d$  pour décrire la cinétique de réaction, par conséquent la nature colloïdale du système complexant est négligée.

En effet, les constantes de réactions  $k'_a$  et  $k_d$  sont définies dans le cadre d'une distribution homogène de sites réactifs dans le milieu. Les ligands L sont donc assimilés à des entités moléculaires dispersées de façon homogène pouvant réagir avec les métaux présents dans la solution. Cependant, dans les écosystèmes aquatiques, les sites réactifs sont en général localisés à la surface ou au sein même des particules. Le transport des ions métalliques depuis la solution vers les ligands, et vice versa, joue alors un rôle déterminant dans la spéciation des métaux et doit être intégré dans des constantes de réaction effectives  $k_a^*$  et  $k_d^*$  prenant la place des constantes  $k_a$  et  $k_d$ . Cette caractéristique est illustrée dans le schéma 1.16.

Pinheiro *et al.* [142] furent les premiers à adopter le couplage transport/cinétique de réaction dans leur analyse de la dynamique de spéciation dans des dispersions de particules colloïdales dures complexantes. Dans cette étude les sites réactifs sont localisés à la surface de particules rigides assurant une distribution hétérogène des ligands dans l'échantillon analysé. Les constantes d'association/dissociation effectives  $k_a^*$  et  $k_d^*$  résultantes ont été déterminées dans le régime stationnaire, c'est-à-dire dans le régime où les flux de métal vers/depuis la

particule –déterminés par le couplage entre transport des métaux et cinétique de réaction– ne dépendent pas du temps. Les auteurs ont notamment démontré que  $k_a^*$  et  $k_d^*$  peuvent diverger



**Figure 1.16.** (A) Représentation d'une distribution homogène de ligands moléculaires. (B) Illustration d'une dispersion de particules colloïdales ligands. La spéciation dynamique est alors régie par le transport de l'ion M vers les sites réactifs et par la réaction de complexation avec les ligands L.

de  $k_a$  et  $k_d$  de plusieurs ordres de grandeurs confirmant que l'utilisation de ces dernières peut amener à une mauvaise interprétation de résultats expérimentaux. En particulier, lorsque le rayon de la particule complexante augmente, le rapport  $k_a^*/k_a$  diminue et la spéciation de métal est alors de plus en plus contrôlée par la diffusion des ions. De plus, dans le cas d'une réaction contrôlée entièrement par les processus de transport, la constante  $k_a^*$  est déterminée par la géométrie de la particule et non pas par  $k_a$ .

Cette étude est cependant limitée au cas des particules dures imperméables alors que, comme mentionné précédemment, les systèmes environnementaux sont en grande partie constitués de particules colloïdales molles. C'est pourquoi cette théorie fut étendue par Duval *et al.* pour l'étude de la dynamique de spéciation dans des suspensions de particules molles définies comme un cœur dur imperméable sphérique enveloppé d'une couche molle dans laquelle les sites ligands sont distribués [143]. Ce modèle est également applicable aux particules dures ou aux particules polyélectrolytes avec un simple ajustement du rapport entre épaisseur de la couche molle et rayon du cœur dur. De plus, il prend en compte la taille des particules (de quelques nm à quelques  $\mu\text{m}$ ) ainsi que les propriétés électrostatiques, hydrodynamiques et l'hétérogénéité spatiale de l'interphase. Dans ce modèle, la spéciation

des métaux est régie par le couplage entre cinétique de complexation chimique intra-particulaire et le transport par diffusion des cations métalliques à l'intérieur et à l'extérieur de la particule. Les auteurs ont pu montrer que les effets de ce couplage sur les propriétés dynamiques du complexe métallique, comme sa labilité, sont liés à la taille et à la nature de la particule complexante (particule dure, polyélectrolyte ou de type cœur/couronne). Cette étude fut elle-même étendue pour considérer l'impact du champ électrostatique local intra et extra-particulaire (transport par diffusion-conduction des métaux vers/depuis les sites réactifs) [144] et pour inclure les effets de flux convectifs et de la perméabilité de la particule (transport par convection des métaux vers/depuis les sites réactifs) [145].

Ces différents formalismes permettent la détermination de la constante de réaction  $k_a^*$  en fonction d'un large panel de paramètres, *i.e.* taille, charge, perméabilité de la particule, conditions de flux hydrodynamique, mais restent toutefois limitées à une gamme de temps restreinte, c'est-à-dire au régime stationnaire.

Ceci nécessite que la distribution de potentiel électrostatique intra et extra-particulaire reste complètement relaxée pendant le transport du métal depuis/vers les sites ligands et pendant l'interconversion chimique du complexe métallique. En d'autres termes, le temps d'établissement du régime stationnaire est très grand devant les temps associés à chaque processus gouvernant la dynamique de l'interphase molle réactive, c'est-à-dire les processus décrits dans le §1.3.3 de ce chapitre auxquels s'ajoutent les processus de relaxation caractéristiques des interphases molles :

- (v) *Transport des ions par diffusion-conduction dans la DCE intra-particulaire d'épaisseur  $l/\kappa_m$ .* Le temps caractéristique associé est défini par  $\tau_r^{(v)} \approx l/(\kappa_m^2 D_{\text{int}})$  où  $D_{\text{int}}$  est le coefficient de diffusion des ions à l'intérieur de la partie molle de la particule. En général, la diffusion des ions dans la couche molle est plus lente que dans le milieu externe en raison de l'encombrement stérique ou des répulsions électrostatiques entre les ions et les sites chargés. La relaxation de la DCE intra-particulaire est donc plus lente que la relaxation de la DCE extra-particulaire.
- (vi) *Gonflement/rétractation de la structure molle de la particule.* L'interphase molle étant flexible (de module d'Young donné), lorsque celle-ci est soumise à une contrainte, sa structure est capable de se déformer et de se relaxer vers un

état d'équilibre selon des processus de relaxation mécanique (ou structurale). Ses contraintes peuvent être de nature hydrodynamique (particules dans un champ de convection) ou osmotique (bactéries soumises à un stress osmotique). Les temps caractéristiques associés à la relaxation mécanique peuvent être compris entre le dixième de seconde jusqu'à plusieurs heures.

A l'image des interactions interparticulaires (§1.3.3), une relaxation complète des distributions de potentiels électrostatiques et de concentrations en ions à l'intérieur et à l'extérieur de la particule doit vérifier l'inégalité  $De_i = \tau_r^i / \tau_{\text{stat}} \ll 1$ , avec  $\tau_{\text{stat}}$  le temps caractéristique pour l'établissement du régime stationnaire, et ce pour l'ensemble des processus de relaxation de temps caractéristique  $\tau_r^i$ .

Cependant, ces conditions ne sont pas toujours satisfaites. Pour illustration, le temps caractéristique pour l'établissement du régime stationnaire, dans le cas d'une spéciation limitée par la diffusion du métal vers/ depuis une particule sphérique complexante, est donné par  $\tau_{\text{stat}} = a^2 / D_M$  (où  $a$  est le rayon de la particule et  $D_M$  est le coefficient de diffusion du cation métallique). Pour des particules de rayon compris entre 1 nm et 1  $\mu$ n,  $\tau_{\text{Diff}}$  est estimé à  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  s. La comparaison de  $\tau_{\text{Diff}}$  avec chaque temps  $\tau_r^i$  montre que pour un ou plusieurs des processus de relaxation de DCE, l'inégalité  $De_i \ll 1$  n'est pas satisfaite. Ceci démontre que la diffusion des cations métalliques depuis/vers les sites réactifs est en général reliée à la dynamique d'établissement des DCEs à intra et extra-particulaires.

De plus, la dynamique de relaxation de DCE (électrodynamique) est couplée à la dynamique de complexation métallique (chémodynamique) dans d'autres situations d'intérêt, comme, par exemple, lorsque l'étape de déshydratation dans le mécanisme d'Eigen (étape généralement la plus lente -  $k_{-\text{H}_2\text{O}}$ ) est du même ordre de grandeur ou plus rapide que l'établissement de la DCE à l'intérieur et/ou à l'extérieur de la particule. Ce couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques aux interphases molles intervient également dans le cas où les cations métalliques participent eux-mêmes à l'établissement des DCEs intra et extra-particulaires. Ce cas est typiquement rencontré lorsque les ions indifférents dans le milieu de dispersion et/ou les sites réactifs distribués à la surface ou au sein des colloïdes ne sont pas en large excès par rapport aux cations métalliques dans le milieu.

#### 1.4.6. Développements clés.

Dans ce chapitre nous avons passé en revue différents travaux théoriques et expérimentaux réalisés afin de déterminer les propriétés électrostatiques, mécaniques et hydrodynamiques d'interphases molles biotiques et abiotiques et d'évaluer leur impact sur la réactivité de ces interphases dans le cadre de leurs interactions électrostatiques avec d'autres interphases et de leur complexation avec des cations métalliques. Toutefois, certains points d'intérêts sont à développer. Cette thèse s'organise autour de plusieurs d'entre eux.

(i) *Interactions électrostatiques entre particules molles multicouches* (Régime d'équilibre thermodynamique).

Ce travail débutera avec l'analyse des interactions électrostatiques entre particules molles multicouches. Il a été souligné que sous certaines conditions l'interaction d'une particule avec une surface/particule est dynamique, c'est-à-dire que les DCEs des objets en interaction ne sont pas complètement relaxées pendant l'intégralité du processus. Cependant, il est important de bénéficier de formalismes théoriques valides uniquement dans le régime d'équilibre électrostatique lorsque les processus de relaxation des DCEs intra et extra-particulaires n'influent pas sur l'interaction des particules, c'est-à-dire lorsque les processus de relaxation des DCEs sont très rapides devant le temps associé à l'interaction entre les deux surfaces.

Ici, il s'agira de développer un formalisme théorique pour l'évaluation des interactions électrostatiques d'interphases molles au-delà des précédents modèles proposées par Ohshima [115-117]. Pour rappel, leur application est limitée en terme de taille des particules en interaction (supérieure à quelques centaines de nm), de magnitude de distribution de potentiel électrostatique à l'intérieur et à l'extérieur des particules (faibles potentiels) et d'hétérogénéité spatiale de la densité de segments polymères et de charge dans la couche molle (couche molle unique caractérisée par une distribution homogène des segments polymères).

Les expressions analytiques développées ne peuvent donc être utilisées en particulier dans le cadre d'interactions impliquant des (bio)particules comme les bactéries (manifestant sur leur membrane des appendices de surface de taille et de propriétés physico-chimiques différentes),

les virus (particules de quelques nm de diamètre constituées de plusieurs couches molles) ou les acides humiques (particules polyélectrolytes de quelques nm de diamètre)\*.

Le formalisme théorique présenté dans le prochain chapitre est capable d'évaluer les homo-interactions (interactions entre mêmes surfaces) et hétéro-interactions (interactions entre surfaces de propriétés physico-chimiques différentes) électrostatiques entre interphases molles multicouches diffuses et ce sans aucune restriction sur leur taille (et donc sur la courbure des particules), la magnitude du potentiel électrostatique local intra/extra-particulaire, la densité de charge des particules, la force ionique du milieu et la distribution spatiale des segments polymères et de la densité de charge.

- (ii) *Réactivité chimique : Couplage entre processus de réaction chimique et dynamique de double couche électrique dans des films mous diffus complexants (Régimes transitoire hors-équilibre et d'équilibre).*

Nous poursuivrons avec un chapitre dédié à la réactivité chimique de (bio)interphases molles, dans lesquelles sont distribués des sites réactifs capables de former des complexes métalliques avec des métaux présents dans le milieu environnant. Le formalisme théorique permet l'examen du couplage entre processus chémodynamiques (transport des cations métalliques vers/depuis les sites réactifs et complexation locale métal-ligand) et processus électrodynamiques (établissement de la DCE) aux (bio)interphases molles et son impact sur *e.g.* la labilité des complexes formés (voir le §1.5.4). Dans cette première étude prenant en compte les processus électrodynamiques, l'interphase molle réactive est un film mou entièrement perméable, *e.g.* un film organique, composé d'une couche unique dont nous contrôlons sans aucune restriction l'épaisseur, la densité de charges portées par les chaînes polymères qui constituent le film et l'hétérogénéité spatiale de la densité de charge. Afin de sonder le couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques sur une large gamme temporelle (ou fréquentielle) depuis les régimes transitoires vers le régime stationnaire, le film mou, initialement à l'équilibre est perturbé électriquement par un champ alternatif de fréquence  $\omega$ , et la réponse diélectrique, *i.e.* variations de la permittivité diélectrique en fonction de  $\omega$ , est examinée.

---

\* Pour plus d'informations se référer au §1.4.2

- (iii) *Réponse diélectrique et mobilité dynamique de suspensions concentrées de particules molles multicouches* (Régimes transitoire hors-équilibre et d'équilibre).

Le chapitre 4 sera consacré à la dernière analyse théorique développée dans le cadre de cette thèse. Il est maintenant clair que la connaissance des processus impliqués dans la polarisation/développement de la DCE autour/au sein de particules et leur dépendance temporelle peut être nécessaire pour appréhender les phénomènes *e.g.* d'interaction et de spéciation. C'est pour cette raison que les propriétés électrodynamiques et hydrodynamiques de ces particules molles multicouches stimulées électriquement sont investies sur une large gamme temporelle (fréquentielle) qui recouvre les régimes transitoires jusqu'à l'équilibre.

Le modèle le plus complet pour l'étude de l'électrodynamique à des interphases molles fut introduit par Ahualli *et al.*[114] Les auteurs ont évalué la permittivité diélectrique et la mobilité dynamique de suspensions concentrées de particules sphériques molles. Ces particules molles sont composées d'un cœur dur entouré d'une seule couche perméable de polymères. De plus la distribution spatiale des segments polymériques est définie par une fonction dite « en escalier » (équation (1.46)). Par conséquent, la répartition des sites chargés dans l'interphase molle est supposée homogène quelles que soient les conditions du milieu, en termes par exemple de concentration en ions ou de pH. Ce modèle n'est donc pas applicable aux suspensions de (bio)particules multicouches ou monocouches diffuses, *e.g.* bactéries, virus, particules microgels, acides humiques, polysaccharides. Ici, il s'agira de déterminer la réponse diélectrique et la mobilité dynamique de suspensions concentrées de particules colloïdales composées d'un cœur dur enveloppé d'une à  $N$  couches de polymères perméables aux ions. De plus la nature plus ou moins diffuse de la distribution des segments polymères est contrôlée *via* un ajustement dans chaque couche du paramètre  $\alpha$  introduit dans le §1.4.2.

- (iv) *Influence de la nature des appendices de surface de souches bactériennes sur leurs propriétés électrostatiques et nanomécaniques* (Régime d'équilibre).

Dans cette étude expérimentale, nous examinerons les propriétés électrostatiques, hydrodynamiques, mécaniques et morphologiques de quatre souches bactériennes *Escherichia Coli* K-12 génétiquement modifiées en fonction de la force ionique du milieu de suspension en utilisant l'électrophorèse et l'AFM. Les souches bactériennes mutantes se différencient par les structures externes qu'elles présentent (ou non) sur leurs parois respectives, c'est-à-dire les

*fimbriae* de type-1, les *pili* de type-F, et les adhésines Ag43 (voir Chapitre 5 §5.1.2). Les résultats expérimentaux seront traités à l'aide de modèles théoriques afin d'en extraire la densité de charge, la perméabilité et le degré d'hétérogénéité spatiale de l'enveloppe bactérienne (électrophorèse), ainsi que l'élasticité et la pression de turgescence en fonction de la force ionique (AFM en mode spectroscopie de force). De plus l'utilisation de l'AFM en mode imagerie nous informera sur les variations de taille des bactéries sujettes à un stress osmotique. Nous montrerons ainsi la relation entre structure et charge de l'enveloppe bactérienne et la capacité de la bactérie et ses structures externes de surface à se contracter lorsqu'ils sont soumis à un stress osmotique.

**Références Bibliographiques.**

1. Delgado, A. V.; Arroyo, F. J., *Interfacial electrokinetics and electrophoresis*. Delgado, A.V. (Ed), Marcel Dekker: New York, 2002, Chap. 1.
2. Helmholtz, H., Studien über elektrische Grenzschichten. *Annales der Physik und Chemie* **1879**, 7, 337-382.
3. Gouy, G., Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *J. Phys.* **1910**, 9, 457-468.
4. Chapman, D. L., A contribution to the theory of electrocapillarity. *Phil. Mag.* **1913**, 25, 475-481.
5. Stern, O., Zur Theorie der elektrischen Doppelschicht. *Z. Elektrochemie* **1924**, 30, 508-516.
6. O'Brien, R. W.; White, L. R., Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1978**, 74, 1607-1626.
7. Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J., Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 309 (2), 194-224.
8. Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Academic Press: London, 1995; Vol. 2.
9. Hunter, R. J., *Zeta Potential in Colloid Science*. Academic Press, New York, 1981.
10. Ohshima, H., A Simple Expression for Henry's Function for the Retardation Effect in Electrophoresis of Spherical Colloidal Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, 168 (1), 269-271.
11. Wiersema, P. H.; Loeb, A. L.; Overbeek, J. T. G., Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *Journal of Colloid and Interface Science* **1966**, 22 (1), 78-99.
12. Ohshima, H.; Healy, T. W.; White, L. R., Approximate analytic expressions for the electrophoretic mobility of spherical colloidal particles and the conductivity of their dilute

suspensions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1983**, 79 (11), 1613-1628.

13. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Effects of stern-layer conductance on electrokinetic transport properties of colloidal particles. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1990**, 86 (16), 2859-2870.

14. O'Brien, R. W.; Ward, D. N., The electrophoresis of a spheroid with a thin double layer. *Journal of Colloid and Interface Science* **1988**, 121 (2), 402-413.

15. Yoon, B. J.; Kim, S., Electrophoresis of spheroidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1989**, 128 (1), 275-288.

16. De Keizer, A.; Van Der Drift, W. P. J. T.; Overbeek Th, J. G., Electrophoresis of randomly oriented cylindrical particles. *Biophysical Chemistry* **1975**, 3 (1), 107-108.

17. Ohshima, H., Electrophoretic Mobility of Soft Particles in Concentrated Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 225 (1), 233-242.

18. Ohshima, H., Electrophoretic Mobility of Spherical Colloidal Particles in Concentrated Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, 188 (2), 481-485.

19. Levine, S.; Neale, G. H., The prediction of electrokinetic phenomena within multiparticle systems. I. Electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, 47 (2), 520-529.

20. Kozak, M. W.; Davis, E. J., Electrokinetics of concentrated suspensions and porous media. I. Thin electrical double layers. *Journal of Colloid and Interface Science* **1989**, 127 (2), 497-510.

21. Kozak, M. W.; Davis, E. J., Electrokinetics of concentrated suspensions and porous media. 2. Moderately thick electrical double layers. *Journal of Colloid and Interface Science* **1989**, 129 (1), 166-174.

22. Lee, E.; Chu, J.-W.; Hsu, J.-P., Electrophoretic Mobility of a Concentrated Suspension of Spherical Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 209 (1), 240-246.

23. Derjaguin, B.; Landeau, L., Theory of the stability of strongly charged lyophilic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta. Phys. Chim.* **1941**, 14, 633-662.

24. Verwey, E. J. W.; Overbeek Th, J. G., *Theory of the stabilité of lyophilic colloids*. Elsevier, Amsterdam, 1948.
25. Israelachvili, J., *Intermolecular & Surface Forces*. Academic Press: London, 1992.
26. Lyklema, J.; van Leeuwen, H. P.; Minor, M., DLVO-theory, a dynamic re-interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science* **1999**, *83* (1-3), 33-69.
27. Shilov, V. N.; Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Horno, J.; López-García, J. J.; Grosse, C., Polarization of the Electrical Double Layer. Time Evolution after Application of an Electric Field. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *232* (1), 141-148.
28. Dukhin, S. S.; Shilov, V. N., Kinetic aspects of electrochemistry of disperse systems. Part II. Induced dipole moment and the non-equilibrium double layer of a colloid particle. *Advances in Colloid and Interface Science* **1980**, *13* (1-2), 153-195.
29. Maxwell, J. C., *Electricity and Magnetism*. Dover, New York, 1892; Vol. 1.
30. Wagner, K. W., Erklärung der dielektrischen Nachwirkungsvorgänge auf grund maxwellscher Vortellungen. *Arch. Elektrotech.* **1914**, *2*, 371-387.
31. O'Konski, C. T., Electric properties of macromolecules. V. Theory of ionic polarization in polyelectrolytes. *Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64* (605-619).
32. Grosse, C.; Delgado, A. V., Dielectric dispersion in aqueous colloidal systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2010**, *15* (3), 145-159.
33. Rica, R. A. Electrokinetics of concentrated suspensions of sphéroidal nanoparticles. University of Granada, Granada, 2011.
34. Ahualli, S.; Delgado, A. V.; Grosse, C., A simple model of the high-frequency dynamic mobility in concentrated suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *301* (2), 660-667.
35. O'Brien, R. W., Electro-acoustic effects in a dilute suspension of spherical particles. *J. Fluid Mech.* **1988**, *190*, 71-86.
36. Babchin, A. J.; Chow, R. S.; Sawatzky, R. P., Electrokinetic measurements by electroacoustical methods. *Advances in Colloid and Interface Science* **1989**, *30* (C), 111-151.

37. Sawatzky, R. P.; Babchin, A. J., Hydrodynamics of electrophoretic motion in an alternating electric field. *Journal of Fluid Mechanics* **1993**, *246*, 321-334.
38. Fixman, M., Thin double layer approximation for electrophoresis and dielectric response. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *78* (3), 1483-1491.
39. James, R. O.; Texter, J.; Scales, P. J., Frequency dependence of electroacoustic (electrophoretic) mobilities. *Langmuir* **1991**, *7* (10), 1993-1997.
40. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle in an oscillating electric field. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1992**, *88* (24), 3567-3581.
41. Gibb, S. E.; Hunter, R. J., Dynamic Mobility of Colloidal Particles with Thick Double Layers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *224* (1), 99-111.
42. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Low-Zeta-Potential Analytic Solution for the Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle in an Oscillating Electric Field. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *160* (2), 275-287.
43. Ohshima, H., Dynamic Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *179* (2), 431-438.
44. Ennis, J.; White, L. R., Dynamic Stern Layer Contribution to the Frequency-Dependent Mobility of a Spherical Colloid Particle: A Low-Zeta-Potential Analytic Solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *178* (2), 446-459.
45. Ennis, J.; White, L. R., High-Frequency Asymptotic Expansion for the Electrokinetic Properties of a Spherical Colloid Particle with Dynamic Stern Layer. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *178* (2), 460-470.
46. Loewenberg, M.; O'Brien, R. W., The dynamic mobility of nonspherical particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *150* (1), 158-168.
47. Loewenberg, M., Unsteady electrophoretic motion of a non-spherical colloidal particle in an oscillating electric field. *Journal of Fluid Mechanics* **1994**, *278*, 149-174.
48. Ohshima, H., Dynamic Electrophoretic Mobility of a Cylindrical Colloidal Particle. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *185* (1), 131-139.

49. Johnson, S. B.; Russell, A. S.; Scales, P. J., Volume fraction effects in shear rheology and electroacoustic studies of concentrated alumina and kaolin suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *141* (1), 119-130.
50. Rider, P. F.; O'Brien, R. W., The dynamic mobility of particles in a non-dilute suspension. *Journal of Fluid Mechanics* **1993**, *257*, 607-636.
51. O'Brien, R. W.; Jones, A.; Rowlands, W. N., A new formula for the dynamic mobility in a concentrated colloid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *218* (1-3), 89-101.
52. Kuwabara, S., The forces experienced by randomly distributed parallel circular cylinders or spheres in a viscous flow at small reynolds numbers. *Journal of the Physical Society of Japan* **1959**, *14* (4), 527-532.
53. Ohshima, H., Dynamic Electrophoretic Mobility of Spherical Colloidal Particles in Concentrated Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *195* (1), 137-148.
54. Dukhin, A. S.; Ohshima, H.; Shilov, V. N.; Goetz, P. J., Electroacoustics for Concentrated Dispersions. *Langmuir* **1999**, *15* (10), 3445-3451.
55. Dukhin, A. S.; Shilov, V. N.; Ohshima, H.; Goetz, P. J., Electroacoustic Phenomena in Concentrated Dispersions: New Theory and CVI Experiment. *Langmuir* **1999**, *15* (20), 6692-6706.
56. Carrique, F.; Arroyo, F. J.; Delgado, A. V., Electrokinetics of Concentrated Suspensions of Spherical Colloidal Particles with Surface Conductance, Arbitrary Zeta Potential, and Double-Layer Thickness in Static Electric Fields. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *252* (1), 126-137.
57. Arroyo, F. J.; Carrique, F.; Ahualli, S.; Delgado, A. V., Dynamic mobility of concentrated suspensions. Comparison between different calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6* (7), 1446-1452.
58. Ahualli, S.; Delgado, A.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Dynamic Electrophoretic Mobility of Concentrated Dispersions of Spherical Colloidal Particles. On the Consistent Use of the Cell Model. *Langmuir* **2006**, *22* (16), 7041-7051.
59. Cole, K. S.; Cole, R. H., Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics. *The Journal of Chemical Physics* **1941**, *9* (4), 341-351.

60. Grosse, C.; Shilov, V. N., Dependence of the dielectric properties of suspensions on the volume fraction of suspended particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *309* (2), 283-288.
61. Schwarz, G., A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution. *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66* (12), 2636-2642.
62. Fixman, M., Charged Macromolecules in External Fields. 2. Preliminary Remarks on the Cylinder. *Macromolecules* **1980**, *13* (3), 711-716.
63. O'Brien, R. W., The response of a colloidal suspension to an alternating electric field. *Advances in Colloid and Interface Science* **1982**, *16* (1), 281-320.
64. O'Brien, R. W., The high-frequency dielectric dispersion of a colloid. *Journal of Colloid and Interface Science* **1986**, *113* (1), 81-93.
65. Lyklema, J.; Dukhin, S. S.; Shilov, V. N., The relaxation of the double layer around colloidal particles and the low-frequency dielectric dispersion. Part I. Theoretical considerations. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1983**, *143* (1-2), 1-21.
66. DeLacey, E. H. B., Dielectric response and conductivity of dilute suspensions of colloidal particles. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1981**, *77* (11), 2007-2039.
67. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Dielectric response of a dilute suspension of spherical colloidal particles to an oscillating electric field. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* **1997**, *93* (17), 3145-3154.
68. Dunstan, D. E.; White, L. R., The dielectric response of dilute polystyrene latex dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *152* (2), 308-313.
69. Delgado, A. V.; González-caballero, F.; Arroyo, F. J.; Carrique, F.; Dukhin, S. S.; Razilov, I. A., Low frequency dielectric dispersion in ethylcellulose latex. Effect of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *131* (1-3), 95-107.
70. Jiménez, M. L.; Arroyo, F. J.; van Turnhout, J.; Delgado, A. V., Analysis of the Dielectric Permittivity of Suspensions by Means of the Logarithmic Derivative of Its Real Part. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *249* (2), 327-335.

71. Kijlstra, J.; Van Leeuwen, H. P.; Lyklema, J., Effects of surface conduction on the electrokinetic properties of colloids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1992**, *88* (23), 3441-3449.
72. Rosen, L. A.; Baygents, J. C.; Saville, D. A., The interpretation of dielectric response measurements on colloidal dispersions using the dynamic Stern layer model. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (5), 4183-4194.
73. Arroyo, F. J.; Carrique, F.; Bellini, T.; Delgado, A. V., Dielectric Dispersion of Colloidal Suspensions in the Presence of Stern Layer Conductance: Particle Size Effects. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *210* (1), 194-199.
74. Delgado, A. V.; Arroyo, F. J.; González-Caballero, F.; Shilov, V. N.; Borkovskaya, Y. B., The effect of the concentration of dispersed particles on the mechanisms of low-frequency dielectric dispersion (LFDD) in colloidal suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *140* (1-3), 139-149.
75. Carrique, F., Dielectric response of concentrated colloidal suspensions. *Journal of Chemical Physics* **2003**, *118* (4), 1945-1956.
76. Bradshaw-Hajek, B. H.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Frequency-Dependent Electrical Conductivity of Concentrated Dispersions of Spherical Colloidal Particles. *Langmuir* **2008**, *24* (9), 4512-4522.
77. Bradshaw-Hajek, B. H.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Dynamic Dielectric Response of Concentrated Colloidal Dispersions: Comparison between Theory and Experiment. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1961-1969.
78. Grosse, C.; Pedrosa, S.; Shilov, V. N., Calculation of the Dielectric Increment and Characteristic Time of the LFDD in Colloidal Suspensions of Spheroidal Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *220* (1), 31-41.
79. Chassagne, C.; Bedeaux, D., The dielectric response of a colloidal spheroid. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *326* (1), 240-253.
80. Rica, R. A.; Jimenez, M. L.; Delgado, A. V., Electric permittivity of concentrated suspensions of elongated goethite particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *343* (2), 564-573.

81. Rica, R. A.; Jiménez, M. L.; Delgado, A. V., Effect of the volume fraction of solids on the concentration polarization around spheroidal hematite particles. *Soft Matter* **2011**, 7 (7), 3286-3289.
82. Poortinga, A. T.; Bos, R.; Norde, W.; Busscher, H. J., Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports* **2002**, 47 (1), 1-32.
83. Ohshima, H., Electrophoretic Mobility of Soft Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, 163 (2), 474-483.
84. Ohshima, H., Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, 62 (2-3), 189-235.
85. Ohshima, H., Electrophoretic mobility of soft particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, 103 (3), 249-255.
86. Duval, J. F. L.; Ohshima, H., Electrophoresis of Diffuse Soft Particles. *Langmuir* **2006**, 22 (8), 3533-3546.
87. Donath, E.; Pastushenko, V., Electrophoretic study of cell surface properties theory and experimental applicability. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1980**, 7 (1), 31-40.
88. Wunderlich, R. W., The effects of surface structure on the electrophoretic mobilities of large particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1982**, 88 (2), 385-397.
89. Levine, S.; Levine, M.; Sharp, K. A.; Brooks, D. E., Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes. *Biophysical Journal* **1983**, 42 (2), 127-135.
90. Sharp, K. A.; Brooks, D. E., Calculation of the electrophoretic mobility of a particle bearing bound polyelectrolyte using the nonlinear Poisson-Boltzmann equation. *biophysical Journal* **1985**, 47, 563-566.
91. Debye, P.; Bueche, A. M., Intrinsic viscosity, diffusion, and sedimentation rate of polymers in solution. *The Journal of Chemical Physics* **1948**, 16 (6), 573-579.
92. Saville, D. A., Electrokinetic Properties of Fuzzy Colloidal Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 222 (1), 137-145.
93. Hill, R. J.; Saville, D. A.; Russel, W. B., Electrophoresis of spherical polymer-coated colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 258 (1), 56-74.

94. Hill, R. J.; Saville, D. A.; Russel, W. B., Polarizability and complex conductivity of dilute suspensions of spherical colloidal particles with charged (polyelectrolyte) coatings. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *263* (2), 478-497.
95. López-García, J. J.; Grosse, C.; Horno, J., Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 1. DC electrophoretic mobility. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *265* (2), 327-340.
96. López-García, J. J.; Grosse, C.; Horno, J., Analysis of the response of suspended colloidal soft particles to a constant electric field. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *286* (1), 400-409.
97. Ohshima, H., Electrophoretic mobility of a highly charged soft particle: Relaxation effect. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *376* (1-3), 72-75.
98. Rotureau, E.; Thomas, F.; Duval, J. F. L., Relationship between Swelling and the Electrohydrodynamic Properties of Functionalized Carboxymethyl-dextran Macromolecules. *Langmuir* **2007**, *23* (16), 8460-8473.
99. Mason, T. G.; Lin, M. Y., Density profiles of temperature-sensitive microgel particles. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2005**, *71* (4), 040801/1-040801/4.
100. Fernández-Nieves, A.; De las Nieves, F. J.; Fernández-Barbero, A., Static light scattering from microgel particles: Model of variable dielectric permittivity. *Journal of Chemical Physics* **2004**, *120* (1), 374-378.
101. Duval, J. F. L.; Wilkinson, K. J.; van Leeuwen, H. P.; Buffle, J., Humic Substances Are Soft and Permeable: Evidence from Their Electrophoretic Mobilities. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (17), 6435-6445.
102. Duval, J. F. L.; van Leeuwen, H. P., Electrokinetics of Diffuse Soft Interfaces. 1. Limit of Low Donnan Potentials. *Langmuir* **2004**, *20* (23), 10324-10336.
103. Duval, J. F. L., Electrokinetics of Diffuse Soft Interfaces. 2. Analysis Based on the Nonlinear Poisson-Boltzmann Equation. *Langmuir* **2005**, *21* (8), 3247-3258.
104. Yezek, L. P.; Duval, J. F. L.; van Leeuwen, H. P., Electrokinetics of Diffuse Soft Interfaces. III. Interpretation of Data on the Polyacrylamide/Water Interface. *Langmuir* **2005**, *21* (14), 6220-6227.

105. Zimmermann, R.; Kuckling, D.; Kaufmann, M.; Werner, C.; Duval, J. r. m. F. L., Electrokinetics of a Poly(N-isopropylacrylamid-co-carboxyacrylamid) Soft Thin Film: Evidence of Diffuse Segment Distribution in the Swollen State. *Langmuir* **2010**, *26* (23), 18169-18181.
106. Duval, J. F. L.; Küttner, D.; Nitschke, M.; Werner, C.; Zimmermann, R., Interrelations between charging, structure and electrokinetics of nanometric polyelectrolyte films. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *362* (2), 439-449.
107. Duval, J. F. L.; Küttner, D.; Werner, C.; Zimmermann, R., Electrohydrodynamics of Soft Polyelectrolyte Multilayers: Point of Zero-Streaming Current. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10739-10752.
108. Gaboriaud, F.; Gee, M. L.; Strugnell, R.; Duval, J. F. L., Coupled Electrostatic, Hydrodynamic, and Mechanical Properties of Bacterial Interfaces in Aqueous Media. *Langmuir* **2008**, *24* (19), 10988-10995.
109. Langlet, J.; Gaboriaud, F.; Gantzer, C.; Duval, J. F. L., Impact of Chemical and Structural Anisotropy on the Electrophoretic Mobility of Spherical Soft Multilayer Particles: The Case of Bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (8), 3293-3312.
110. Duval, J. F. L.; Busscher, H. J.; van de Belt-Gritter, B.; van der Mei, H. C.; Norde, W., Analysis of the Interfacial Properties of Fibrillated and Nonfibrillated Oral Streptococcal Strains from Electrophoretic Mobility and Titration Measurements: Evidence for the Shortcomings of the 'Classical Soft-Particle Approach'. *Langmuir* **2005**, *21* (24), 11268-11282.
111. Jiménez, M. L.; Delgado, A. V.; Ahualli, S.; Hoffmann, M.; Witteman, A.; Ballauff, M., Giant permittivity and dynamic mobility observed for spherical polyelectrolyte brushes. *Soft Matter* **2011**, *7* (8), 3758-3762.
112. López-García, J. J.; Grosse, C.; Horno, J., Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 2. AC electrokinetic and dielectric properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *265* (2), 341-350.
113. Ohshima, H., Dynamic Electrophoretic Mobility of a Soft Particle. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *233* (1), 142-152.
114. Ahualli, S.; Jiménez, M. L.; Carrique, F.; Delgado, A. V., AC Electrokinetics of Concentrated Suspensions of Soft Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1986-1997.

115. Ohshima, H.; Kondo, T., Electrostatic Double-Layer Interaction between Two Charged Ion-Penetrable Spheres: An Exactly Solvable Model. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *155* (2), 499-505.
116. Ohshima, H., Electrostatic interaction between soft particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *328* (1), 3-9.
117. Ohshima, H., Electrostatic interaction between two spherical soft particles at small separations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *379* (1–3), 18-20.
118. Dufrêne, Y. F., Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of Bacteriology* **2002**, *184* (19), 5205-5213.
119. Dufrêne, Y. F., Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2* (6), 451-460.
120. Dufrêne, Y. F., Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nature Reviews Microbiology* **2008**, *6* (9), 674-680.
121. Arnoldi, M.; Fritz, M.; Bauerlein, E.; Radmacher, M.; Sackmann, E.; Boulbitch, A., Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Physical Review E* **2000**, *62* (1), 1034-1044.
122. Touhami, A.; Nysten, B.; Dufrêne, Y. F., Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2003**, *19* (11), 4539-4543.
123. Pelling, A. E.; Sehati, S.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S.; Gimzewski, J. K., Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **2004**, *305* (5687), 1147-1150.
124. Gaboriaud, F.; Bailet, S.; Dague, E.; Jorand, F., Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187* (11), 3864-3868.
125. Francius, G.; Tesson, B.; Dague, E.; Martin-Jézéquel, V.; Dufrêne, Y. F., Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology* **2008**, *10* (5), 1344-1356.

126. Francius, G.; Lebeer, S.; Alsteens, D.; Wildling, L.; Gruber, H. J.; Hols, P.; Keersmaecker, S. D.; Vanderleyden, J.; Dufrêne, Y. F., Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACS Nano* **2008**, *2* (9), 1921-1929.
127. Ahimou, F.; Denis, F. A.; Touhami, A.; Dufrêne, Y. F., Probing Microbial Cell Surface Charges by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2002**, *18* (25), 9937-9941.
128. Dupres, V.; Menozzi, F. D.; Locht, C.; Clare, B. H.; Abbott, N. L.; Cuenot, S.; Bompard, C.; Raze, D.; Dufrêne, Y. F., Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nature Methods* **2005**, *2* (7), 515-520.
129. Hinterdorfer, P.; Dufrêne, Y. F., Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods* **2006**, *3* (5), 347-355.
130. Dague, E.; Alsteens, D.; Latgé, J.-P.; Verbelen, C.; Raze, D.; Baulard, A. R.; Dufrêne, Y. F., Chemical Force Microscopy of Single Live Cells. *Nano Letters* **2007**, *7* (10), 3026-3030.
131. Alsteens, D.; Dague, E.; Rouxhet, P. G.; Baulard, A. R.; Dufrêne, Y. F., Direct Measurement of Hydrophobic Forces on Cell Surfaces Using AFM. *Langmuir* **2007**, *23* (24), 11977-11979.
132. Van Leeuwen, H. P.; Town, R. M.; Buffle, J.; Cleven, R. F. M. J.; Davison, W.; Puy, J.; Van Riemsdijk, W. H.; Sigg, L., Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39* (22), 8545-8556.
133. Zhang, H.; Davison, W., Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* **1995**, *67* (19), 3391-3400.
134. Parthasarathy, N.; Buffle, J., Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: Application to copper speciation. *Analytica Chimica Acta* **1994**, *284* (3), 649-659.
135. Slaveykova, V. I.; Parthasarathy, N.; Buffle, J.; Wilkinson, K. J., Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters. *Science of The Total Environment* **2004**, *328* (1-3), 55-68.
136. van Leeuwen, H. P.; Town, R. M., Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP): Part 1. Fundamental features. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, *536* (1-2), 129-140.

137. van Leeuwen, H. P.; Town, R. M., Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 4. The kinetic current regime. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *561*, 67-74.
138. Morel, F. M. M.; Hering, J. G., *Principles and applications of aquatic chemistry*. John Wiley: New York, 1993.
139. van Leeuwen, H. P., Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Inert and Labile Complexes. *Environmental Science & Technology* **1999**, *33* (21), 3743-3748.
140. Botelho, C. M. S.; Boaventura, R. A. R.; Gonçalves, M. L. S. S., Interactions of Pb(II) with particles of a polluted river. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *462* (1), 73-85.
141. Botelho, C. M. S.; Boaventura, R. A. R.; González-Caballero, F., Copper Complexation with Soluble and Surface Freshwaters Ligands. *Electroanalysis* **2002**, *14* (24), 1713-1721.
142. Pinheiro, J. P.; Minor, M.; van Leeuwen, H. P., Metal Speciation Dynamics in Colloidal Ligand Dispersions. *Langmuir* **2005**, *21* (19), 8635-8642.
143. Duval, J. F. L.; Pinheiro, J. P.; Leeuwen, H. P. v., Metal Speciation Dynamics in Monodisperse Soft Colloidal Ligand Suspensions. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112* (31), 7137-7151.
144. Duval, J. F. L., Metal Speciation Dynamics in Soft Colloidal Ligand Suspensions. Electrostatic and Site Distribution Aspects. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (11), 2275-2293.
145. Duval, J. F. L.; Qian, S., Metal speciation dynamics in dispersions of soft colloidal ligand particles under steady-state laminar flow condition. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (46), 12791-12804.



## Chapitre 2

# Interactions Electrostatiques entre (Bio)Particules Molles Multicouches

Duval, J. F. L.; Merlin, J.; Narayana, P. A. L., Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: Beyond Debye-Hückel approximation and Deryagin formulation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *13* (3), 1037-1053.



Les systèmes naturels environnementaux sont constitués majoritairement de colloïdes biotiques et abiotiques dont les propriétés électrostatiques, hydrodynamiques et mécaniques déterminent en grande partie leur réactivité dans le cadre des interactions avec d'autres (bio)particules/surfaces ou des ions métalliques traces.

Les interactions électrostatiques jouent un rôle déterminant dans divers processus colloïdaux et d'interfaces comme l'hétérocoagulation, le dépôt de particules ou l'adsorption de protéines sur des surfaces. Jusqu'à maintenant, de nombreuses études théoriques ont été dédiées à l'évaluation de ces interactions électrostatiques entre particules dures et imperméables. Cependant, ces différents modèles sont inadaptés pour des (bio)particules telles que les bactéries, les virus, les levures, les acides humiques ou les particules microgels... En effet, ces (bio)particules sont molles, c'est-à-dire qu'elles sont composées (ou non) d'un cœur dur imperméable aux ions et au solvant qui est enveloppé d'une couche perméable de polyélectrolyte. Les groupements ionogéniques qui y sont localisés sont portés par les chaînes polymériques constituant la couche perméable et, par conséquent, ne sont pas strictement localisés à la surface de la particule dure. Des travaux théoriques et expérimentaux ont démontré que les propriétés électrocinétiques de ces particules molles diffèrent considérablement de celles de leurs homologues dits durs, c'est-à-dire imperméables.

Les interactions électrostatiques entre (bio)particules molles gouvernent en grande partie les phénomènes d'interface comme l'adhésion microbienne ou l'infection bactérienne. C'est pourquoi des études théoriques ont été développées, principalement par Ohshima, pour quantifier ces interactions impliquant des particules molles [1-4]. Des expressions analytiques ont été obtenues pour des particules enveloppées d'une seule couche perméable portant des groupes ionogéniques complètement dissociés et distribués de façon homogène. De plus, elles sont applicables aux particules dont la densité de charge dans la couche perméable autorise l'approximation de Debye-Hückel et dont la taille permet l'utilisation de l'approximation dite de Derjaguin (voir le chapitre 1 §1.4.3). L'application de ces formalismes aux (bio)particules est cependant limitée principalement pour les raisons suivantes :

- (i) La linéarisation de l'équation de Poisson – Boltzmann est inappropriée pour de faibles forces ioniques, c'est-à-dire dans la gamme de concentrations en électrolyte où l'énergie associée à l'interaction entre les particules devient grande devant l'énergie thermique.

- (ii) Alors que l'utilisation de l'approximation de Derjaguin est tout à fait légitime dans le cadre d'interactions entre grandes (bio)particules (bactéries de rayon  $\approx 300-500\text{nm}$ ), celle-ci ne demeure plus valide pour des systèmes dont la taille est de l'ordre du nanomètre (virus  $\approx 10-20\text{nm}$ , acides humiques  $\approx 5-10\text{nm}$ , ou encore les nanoparticules métalliques  $\approx 1-10\text{nm}$ ). Dans ces cas, il est nécessaire de tenir compte de la courbure de ces petites particules dans le calcul des énergies d'interaction électrostatique pour les gammes de forces ioniques d'intérêt (typiquement 1-100 mM) et de distance de séparation entre particules où les doubles couches électriques se recouvrent sensiblement.
- (iii) Les microorganismes tels que les bactéries et les virus ne peuvent être en général réduits à des particules molles composées d'une seule couche perméable. A titre d'exemple, les bactéries manifestent à la surface de leur membrane divers appendices dont la taille peut varier de quelques nanomètres au micromètre. Parmi ces structures de surfaces, nous pouvons citer les *fimbriae*, les *pili*, la capsule, les revêtements protéiques et les lipopolysaccharides (LPS). Ces différentes structures peuvent former différentes couches perméables avec pour chacune, une épaisseur, une densité de charge et des degrés de dissociation des groupements chargés distincts. Quant aux virus de type *e.g.* MS2, ils peuvent être considérés comme des particules sphériques très poreuses comportant trois couches molles de compositions différentes. Le centre de la particule est en effet composé de l'ARN, lui-même enveloppé d'une deuxième couche d'ARN lié à la capsidie protéique qui forme la couche la plus externe.

Afin d'interpréter à l'aide de formalismes théoriques des résultats expérimentaux impliquant de telles (bio)interphases molles, un traitement rigoureux des interactions électrostatiques entre (bio)particules diffuses molles et multicouches est requis. D'après les arguments cités, il est clair que les interactions électrostatiques impliquant des systèmes multicouches doivent être évaluées dans les situations où les approximations de Derjaguin et/ou Debye-Hückel ne peuvent être appliquées. De plus, la théorie doit intégrer les hétérogénéités spatiales de distribution de densité de charge (caractéristique inhérente aux interphases diffuses) ainsi qu'une dissociation partielle (dépendant du pH et de la force ionique du milieu) des groupes ionogéniques distribués à l'intérieur des diverses couches

perméables. Cette modélisation est nécessaire pour déterminer la contribution de chaque couche perméable des particules dans leurs interactions.

Toutes ces caractéristiques sont réunies dans le formalisme théorique présenté dans ce chapitre sous la forme d'une publication. Après une description du système étudié, la théorie est développée pour les interactions électrostatiques entre interphases molles multicouches diffuses et planes. A partir de ces résultats, les interactions électrostatiques entre particules multicouches dont le rayon est de l'ordre de quelques centaines de nm, *e.g.* bactéries, sont estimées en appliquant le traitement de Derjaguin. Dans une seconde partie, la théorie est modifiée pour intégrer les situations où le traitement de Derjaguin n'est plus justifié, c'est-à-dire les situations où les particules molles possèdent un rayon de quelques dizaines de nm ou moins. Dans une troisième partie, des simulations numériques sont discutées pour les deux cas décrits. Celles-ci mettent en relief les limites d'équations analytiques dérivées dans ce travail dans le cadre de l'approximation de Debye-Hückel. De plus, elles démontrent que les interactions électrostatiques entre des systèmes mous multicouches peuvent significativement ou exclusivement être gouvernées par les propriétés (épaisseur, signe, localisation et magnitude de la densité de charge) des couches les plus internes.

1. Ohshima, H., Electrostatic interaction between soft particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 328 (1), 3-9.
2. Ohshima, H.; Hyono, A., Electrostatic interaction between two cylindrical soft particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 333 (1), 202-208.
3. Ohshima, H.; Kondo, T., Electrostatic Double-Layer Interaction between Two Charged Ion-Penetrable Spheres: An Exactly Solvable Model. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, 155 (2), 499-505.
4. Hyono, A.; Gaboriaud, F.; Mazda, T.; Takata, Y.; Ohshima, H.; Duval, J. F. L., Impacts of Papain and Neuraminidase Enzyme Treatment on Electrohydrodynamics and IgG-Mediated Agglutination of Type A Red Blood Cells. *Langmuir* **2009**, 25 (18), 10873-10885.

# Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye–Hückel approximation and Deryagin formulation†

Jérôme F. L. Duval,\* Jenny Merlin and Puranam A. L. Narayana

Received 15th March 2010, Accepted 6th October 2010

DOI: 10.1039/c004243a

We report a steady-state theory for the evaluation of electrostatic interactions between identical or dissimilar spherical soft multi-layered (bio)particles, *e.g.* microgels or microorganisms. These generally consist of a rigid core surrounded by concentric ion-permeable layers that may differ in thickness, soft material density, chemical composition and degree of dissociation for the ionogenic groups. The formalism allows the account of diffuse interphases where distributions of ionogenic groups from one layer to the other are position-dependent. The model is valid for any number of ion-permeable layers around the core of the interacting soft particles and covers all limiting situations in terms of nature of interacting particles, *i.e.* homo- and hetero-interactions between hard, soft or entirely porous colloids. The theory is based on a rigorous numerical solution of the non-linearized Poisson–Boltzmann equation including radial and angular distortions of the electric field distribution within and outside the interacting soft particles in approach. The Gibbs energy of electrostatic interaction is obtained from a general expression derived following the method by Verwey and Overbeek based on appropriate electric double layer charging mechanisms. Original analytical solutions are provided here for cases where interaction takes place between soft multi-layered particles whose size and charge density are in line with Deryagin treatment and Debye–Hückel approximation. These situations include interactions between hard and soft particles, hard plate and soft particle or soft plate and soft particle. The flexibility of the formalism is highlighted by the discussion of few situations which clearly illustrate that electrostatic interaction between multi-layered particles may be partly or predominantly governed by potential distribution within the most internal layers. A major consequence is that both amplitude and sign of Gibbs electrostatic interaction energy may dramatically change depending on the interplay between characteristic Debye length, thickness of ion-permeable layers and their respective protolytic features (*e.g.* location, magnitude and sign of charge density). This formalism extends a recent model by Ohshima which is strictly limited to interaction between soft mono-shell particles within Deryagin and Debye–Hückel approximations under conditions where ionizable sites are completely dissociated.

## 1. Introduction

Electrostatic interactions play a key role in governing a variety of colloidal and interfacial phenomena, *e.g.* heterocoagulation,<sup>1–5</sup> particle deposition,<sup>6</sup> protein adsorption,<sup>7–10</sup> or rheological behavior.<sup>11</sup> Over the past decades, much effort has been devoted to the theoretical evaluation of Gibbs electrostatic interaction energy between rigid, impermeable hard particles. Numerous formalisms were provided for this purpose and some of them account for particle surface charge regulation

mechanisms,<sup>2–4,12–24</sup> effects of particle surface roughness<sup>5,24–32</sup> or chemical surface heterogeneities.<sup>5</sup> For soft (bio)colloidal systems like bacteria,<sup>33,34</sup> viruses,<sup>35</sup> yeasts,<sup>36</sup> humic acids<sup>37</sup> or microgel particles,<sup>38</sup> locating the charge at the particle ‘surface’ is clearly inappropriate.<sup>39–41</sup> Instead, these particles generally consist of a hard core surrounded by a permeable polyelectrolyte layer pictured by a three-dimensional distribution of ionogenic groups supported by polymer chains. Depending on the thickness of this layer as compared to the core radius, soft particles reduce to hard or entirely porous colloids.<sup>39</sup> Soft systems also include planar surfaces that bear *e.g.* polymer or protein layers.<sup>42</sup> Theoretical and experimental studies have now established that the electrokinetic properties of soft particles or soft plates substantially differ from those of their rigid counterparts.<sup>39–42</sup> (see further references in the review ref. 41). In particular, they underpin the necessity to abandon the concepts of zeta-potential for representing adequately the distributions of electrostatic potential and electroosmotic/pressure-driven flows within and/or outside soft systems under electrokinetic conditions. In another context, it was recently demonstrated that the soft character of ligand particles may

Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, UMR7569 CNRS, BP 40 – F-54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: jerome.duval@ensg.inpl-nancy.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: (i) Analytical expression for the electrostatic potential profile within Debye–Hückel and Deryagin approximations for  $\alpha_k \rightarrow 0$  (homogeneous site distribution) and  $\mu_k(y) = 1$  (complete dissociation of ionogenic groups). (ii) Semi-analytical formulation of  $\Pi(H)$ ,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{P-P}}(H)$  and  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{SP-SP}}(H)$  within Debye–Hückel and Deryagin approximations for  $\alpha_k \rightarrow 0$  and  $\mu_k(y) \neq 1$ . (iii) Computation of 2D potential distribution between soft multi-layered particles using COMSOL Multiphysics environment. See DOI: 10.1039/c004243a

lead to metal speciation dynamic features that are dramatically different from those expected for hard ligand colloids.<sup>43</sup>

Like for hard particles, electrostatic interaction between soft (bio)particles are of utmost importance in controlling interfacial processes such as microbial adhesion,<sup>44</sup> or bacterial infection.<sup>45,46</sup> In an effort to quantify such soft particle interactions, theoretical models have been proposed only recently and mainly by Ohshima.<sup>47,48</sup> In ref. 47, electrostatic interaction between spherical soft particles is analyzed for the case where particles carry a single shell where ionogenic groups are completely dissociated and homogeneously distributed. The analytical equations given in ref. 47 are strictly applicable to soft particles whose charge density within the shell is in line with linearization of the Poisson–Boltzmann (PB) equation. Results remain further valid for soft particle sizes in agreement with Deryagin treatment.<sup>49</sup> The latter consists in evaluating the electrostatic interaction energy between the particles from that per unit area of the corresponding parallel planar surfaces. Ohshima also derived the exact expression for the electrostatic interaction between two spherical, porous, homogeneous particles,<sup>50</sup> albeit within the low charge density case and under conditions of complete dissociation of ionizable groups.

Despite the pioneering character of Ohshima's formulations, their degree of application to (bio)particles remains severely limited mainly for the following reasons:

(i) Regardless of the magnitude of the charge density within the shell of a given soft particle, use of the linearized PB equation for formulation of electrostatics becomes necessarily invalid at sufficiently low electrolyte concentrations, *i.e.* within the range of ionic strengths where electrostatic interaction energy between particles becomes significant as compared to thermal energy.

(ii) Though Deryagin treatment is justified for evaluating electrostatic interactions between large (bio)colloids like bacteria (typical radius of  $\sim 300$ – $500$  nm), it is inadequate for interaction situations involving nm-sized particles, *e.g.* humic acids ( $\sim 2$ – $5$  nm)<sup>37</sup> or viruses (radius  $\approx 10$ – $20$  nm).<sup>35</sup> For such particles, it is indeed essential to account for the impact of particle curvature on Gibbs electrostatic interaction energy within practical ranges of ionic strengths (1 mM to 100 mM) and range of particle separation distances where electric double layers start to overlap appreciably.

(iii) For the specific case of microorganisms, their assimilation to soft, homogeneous, mono-shell particles is generally oversimplified. Bacteria may indeed exhibit ion-penetrable subsurface organizations that gradually protrude from the soft cell membrane over distances ranging from few nm up to the  $\mu\text{m}$  scale (see review ref. 34 and references therein). Among these microbial soft surface ultrastructures, one may quote pili, auto-transporter proteins, fimbriae, fibrils, capsule (polymeric fringe) or lipopolysaccharides (LPS). For some native or mutant bacteria of the class *Klebsiella pneumoniae*,<sup>46</sup> the soft part includes up to three different components, *i.e.* cell membrane, LPS and capsule, each characterized by distinct charge densities, thickness and charge dissociation features. As a further example, viruses, *e.g.* of the type MS2, may be assimilated to porous spherical particles which consist of a confined soft RNA part surrounded by a RNA shell layer

bound to an external soft proteic capsid.<sup>35,51</sup> Finally, many planar soft systems are multi-layered, see *e.g.* multi-layered charged polymer or protein coated-surfaces, or surfaces supporting biomimetic materials.<sup>52,53</sup>

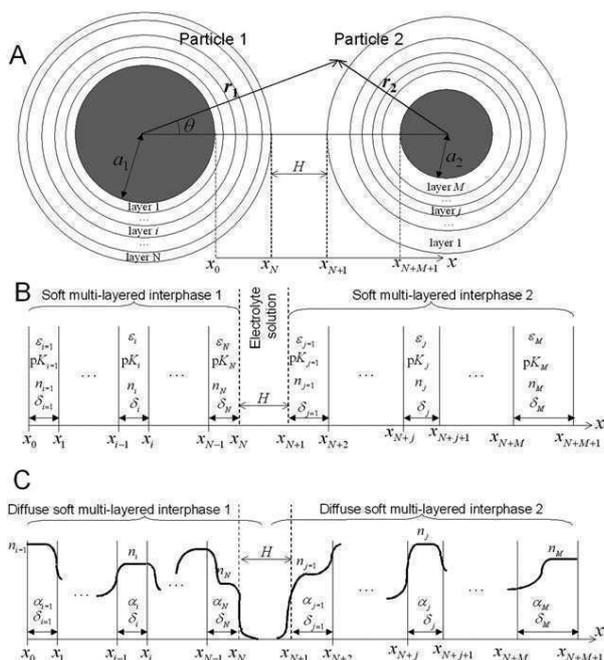
In view of the above elements, it is clear that experimentalists are generally confronted to a large panel of soft surface layer organizations and a broad range of (bio)particle size, magnitude of charge densities and particle curvatures (spherical particle *versus* planar interphase). For this reason, if experimental results obtained over a wide range of electrolyte concentrations or pH conditions are to be interpreted with theory, a rigorous treatment of electrostatic interactions between diffuse, soft multi-layered (bio)particles is necessarily required. It is further timely to tackle electrostatic interaction situations involving soft multi-layered systems where Deryagin and/or Debye–Hückel approximations are unrealistic. In addition, the theory must be sufficiently flexible to include spatial heterogeneities for the charge density distribution—feature that is inherent to diffuse interphases<sup>40</sup>—as well as partial dissociation of ionogenic groups distributed within the various ion-permeable layers. This modeling is necessary to determine in an appropriate manner the role played by each layer within the soft component of the interacting particles in determining their overall interaction features.

We propose in the current analysis a formulation of such a theory. The manuscript is organized as follows. After setting the general features of the model, the theory is first developed for the electrostatic interaction between diffuse soft planar multi-layered interphases. On the basis of these results, we estimate the electrostatic interactions between multi-layered particles with a radius of few hundreds of nm, *e.g.* bacteria or large porous aggregates, following Deryagin treatment. In a second part, the theory is amended for situations where the validity of Deryagin approach is obviously very limited, as it is the case for soft particles of few tens of nm in radius or below. In a third part, typical numerical simulations are discussed for the two above cases. These clearly underline the limits of analytical equations we derive here within the framework of Debye–Hückel approximation. Also, they unambiguously show that electrostatic interactions between soft multi-layered systems may significantly or exclusively be governed by the properties (thickness, sign/location/magnitude of charge density) of the most internal layers.

## 2. Theory

### 2.1 Setting the problem

**2.1.1 Nomenclature.** In the following, we consider the electrostatic interaction between two spherical soft multi-layered particles at equilibrium, denoted as particle 1 and particle 2, immersed in a symmetrical  $z : z$  electrolyte solution of bulk concentration  $c^\infty$ . The radius of the hard core for these particles is  $a_1$  and  $a_2$ , respectively (Fig. 1A). The soft part of particles 1 and 2 consists in a succession of  $N$  and  $M$  concentric ion-permeable layers surrounding the core, respectively, thereby forming the multi-layered interphases 1 and 2 (Fig. 1B). To each ion-permeable layer around particle 1, we assign the index  $i$ , where  $i = 1$  pertains to the most



**Fig. 1** (A) Schematic representation of two interacting soft multi-layered particles, denoted as particle 1 and particle 2, separated by the distance  $H$ . The figure details the spatial coordinates  $(r_1, r_2, \theta)$  and  $x$  as well as the nomenclature adopted for layers indexing. (B) Nomenclature used for modeling the protolytic features of each layer surrounding particles 1 and 2. See main text and Glossary for further details. (C) Schematic drawing of situations where the distribution  $n(x)$  of ionizable sites concentration from the core surface of particle 1 to that of particle 2 is described by a continuous function with smooth transition between two adjacent layers. The progressivity of the transition is ruled by the parameter  $\alpha_k$ .

internal layer and  $i = N$  to that located at the outer edge of particle 1. For particle 2, layers are positioned according to the index  $j$  where  $j = 1$  refers to the most external layer and  $j = M$  to that located in the direct vicinity of the core (Fig. 1A). The particles are separated by the distance  $H$  and thickness of layer  $i = 1, \dots, N$  (particle 1) and  $j = 1, \dots, M$  (particle 2) is denoted as  $\delta_i$  and  $\delta_j$ , respectively. We locate the various layers *via* the space variable  $x$  that refers to the dimension perpendicular to the core surfaces (Fig. 1B).  $x$  runs from the position  $x_0 = 0$  to  $x_{N+M+1} = H + \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j$ , which corresponds to locations of the core surface of particles 1 and 2, respectively. This coordinate system is adapted for the evaluation of electrostatic interaction between spherical particles or between spherical particle and planar interphase on the premise that particle sizes fully justify application of Deryagin method detailed in Section 2.2. For other cases that require a rigorous two-dimensional formulation of the electrostatic potential distribution across the multi-layered interphases, details on appropriate coordinate system are provided in Section 2.3.

In the developments that follow, the thickness of each multi-layered interphase is independent of  $H$ , thereby excluding any possible deformation and reorganization of the various ion-permeable layers upon approach of the particles. This is necessarily approximate, especially at very short separation

distances where (attractive or repulsive) steric interactions are likely to play a key role. Despite this difficulty, the theory below remains acceptable because the decay of the Gibbs steric interaction energy with particle separation distance  $H$  is several orders steeper than that for the Gibbs electrostatic interaction energy.<sup>54</sup> In addition, the steady-state model adopted here disregards the possible deformation of the ion-permeable layers as the result of electrostatic force they undergo following approach of the particles in interaction. This is legitimate providing that the stiffness (Young modulus) of the layers is sufficiently large to counteract the aforementioned electrostatic force. For those cases of very flexible polymeric interphases, more refined models should integrate the mechanical (viscoelastic) properties of the layers together with the dynamics of chains reorganization and that of electric double layer formation. For the sake of readability, each layer is further assumed to contain a single type of dissociable ionogenic groups. Straightforward modifications of the formalism along the lines detailed in ref. 35 may be done to account for the simultaneous presence of groups of different natures within a given layer. Finally, the formalism integrates the possibility of a smooth transition for the concentration profile of a given ionogenic group from one layer to the other (Fig. 1C).

**2.1.2 Distribution profile for the concentration of ionogenic groups across the interacting multi-layered interphases.** The charge density carried by a given layer  $i$  or  $j$  is assumed to originate either from the deprotonation of basic groups (e.g. ammonium groups), denoted  $\equiv\text{RH}_{i=1, \dots, M}^+$  and  $\equiv\text{RH}_{j=1, \dots, M}^+$ , or from that of acid groups (e.g. carboxylic groups),  $\equiv\text{RH}_{i=1, \dots, M}$  and  $\equiv\text{RH}_{j=1, \dots, M}$ , where  $\equiv\text{R}$  refers to the polymeric material supporting the protons.<sup>35,37,38</sup> These charging mechanisms are given by the following acid–base equilibria



and



where the index  $k$  is defined by  $k = i$  and  $k = j$  when referring to the  $i$ th-layer and  $j$ th-layer of multi-layered interphases 1 and 2, respectively. In order to specify the type of reaction relevant for a given layer  $k$ , we set  $\varepsilon_k = -1$  when eqn (1) applies. In the other case where eqn (2) adequately depicts the origin of the charge, we pose  $\varepsilon_k = +1$ . The acidity constant associated to the relevant acid–base reaction taking place in the  $k$ th-layer is then denoted  $K_k = 10^{-\text{p}K_k}$ . The volume concentration of ionogenic groups within the  $k$ th-shell layer is called  $n_k$ . Within this picture of multi-layered interphases, the profile for the concentration of ionogenic groups,  $n(x_0 < x < x_{N+M+1})$ , consists in a succession of square functions of amplitude  $n_i$  for  $i = 1, \dots, N$  and  $n_j$  for  $j = 1, \dots, M$  (Fig. 1B).

For many (biological) systems, the spatial distribution for the density of soft material that supports the ionogenic groups, or for that matter  $n(x)$ , is not described by a simple succession of discontinuous square functions.<sup>34,41,51</sup> In order to account for the required smooth transition of  $n(x)$  between neighboring layers, we extend the diffuse soft mono-shell interphasial representation introduced by Duval and Ohshima within

electrokinetic theory<sup>40</sup> to the situation of diffuse soft multi-layered interphase.  $n(x)$  is then constructed by means of appropriate series of tanh-like functions according to

$$x_0 \leq x \leq x_{N+M+1}: n(x) = \chi^{(1)} n_N g^{(1)}(x) + \chi^{(2)} n_{j=1} g^{(2)}(x, H) \quad (3)$$

where  $g^{(1)}(x)$  and  $g^{(2)}(x, H)$  refer to the spatial distribution of ionogenic groups across multi-layered interphases 1 and 2 separated by distance  $H$  via

$$x_0 \leq x: g^{(1)}(x) = \frac{1}{n_N} \sum_{i=1}^{N-1} \{n_i - n_{i+1}\} f_i(x) + f_N(x), \quad (4)$$

$$\begin{aligned} x \leq x_{N+M+1}: g^{(2)}(x, H) \\ = \frac{1}{n_{j=1}} \sum_{j=2}^M \{n_j - n_{j-1}\} f_j(x, H) + f_{j=1}(x, H), \end{aligned} \quad (5)$$

with

$$f_{i=1, \dots, N}(x) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \frac{x - x_0 - \sum_{k=1}^i \delta_k}{\alpha_i} \right] \right\}, \quad (6)$$

$$f_{j=1}(x, H) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \frac{-x + x_0 + H + \sum_{k=1}^N \delta_k}{\alpha_{j=1}} \right] \right\}, \quad (7a)$$

and

$$f_{j=2, \dots, M}(x, H) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \frac{-x + x_0 + H + \sum_{k=1}^N \delta_k + \sum_{k=1}^{j-1} \delta_k}{\alpha_j} \right] \right\}. \quad (7b)$$

It is emphasized that the distribution  $n(x)$  given by eqn (3)–(7) is continuous for any position  $x$  between  $x_0$  and  $x_{N+M+1}$ . The smooth transition for the profile  $n(x)$  between two adjacent layers  $k$  and  $k + 1$  is ruled by the quantities  $\alpha_k$  (Fig. 1C). In the limit where all  $\alpha_k \rightarrow 0$ , eqn (4), (6) and eqn (5), (7) reduce to a succession of step functions. For a given interparticular separation distance  $H$ , the limits of  $g^{(1)}$  and  $g^{(2)}$  for  $x \gg x_N$  and  $x \ll x_{N+1}$ , respectively, are zero. We exclude in the following any overlap of the diffuse tails of the multi-layered interphases 1 and 2 within the spatial region  $x_N \leq x \leq x_{N+1}$  (Fig. 1C). This constrain is ensured by considering systems that fulfill the condition  $H \gg \alpha_N + \alpha_{j=1}$ . In order to adequately analyze the effect of ionizable site concentration distribution within each multi-layered interphase on their overall electrostatic interaction features, it is required that the total amount of ionizable sites across multi-layered interphases 1 and 2 is maintained constant upon variation of  $\alpha_k$ .<sup>40</sup> This is done by defining the constants  $\chi^{(1)}$  and  $\chi^{(2)}$  in eqn (3)

according to

$$\chi^{(1)} = \frac{n_{i=1} \{ (a_1 + \delta_{i=1})^\xi - a_1^\xi \} + \sum_{i=2}^N n_i \left\{ \left( a_1 + \sum_{k=1}^i \delta_k \right)^\xi - \left( a_1 + \sum_{k=1}^{i-1} \delta_k \right)^\xi \right\}}{\xi n_N \int_{x_0}^{\infty} (x + a_1)^{\xi-1} g^{(1)}(x) dx} \quad (8)$$

and

$$\chi^{(2)} = \frac{n_M \{ (a_2 + \delta_M)^\xi - a_2^\xi \} + \sum_{j=1}^{M-1} n_j \left\{ \left( a_2 + \sum_{k=j}^M \delta_k \right)^\xi - \left( a_2 + \sum_{k=j+1}^M \delta_k \right)^\xi \right\}}{\xi n_{j=1} \int_{x_0}^{x_{N+M+1}} (x_{N+M+1} + a_2 - x)^{\xi-1} g^{(2)}(x, H) dx} \quad (9)$$

In eqn (8) and (9),  $\xi = 3$  and  $\xi = 1$  refer to the case of spherical multi-layered particles (Fig. 1A) and planar multi-layered interphases (Fig. 1B), respectively.

### 2.1.3 Charge density distribution across the multi-layered interphases 1 and 2.

The local density of fixed charges at a given position  $x$  ( $x_0 \leq x \leq x_{N+M+1}$ ), denoted as  $\rho_{\text{fix}}$ , depends on the corresponding local concentration of ionizable sites,  $n(x)$  (eqn (3)–(7)), on local dimensionless electrostatic potential  $y(x)$  ( $y(x) = zF\psi(x)/RT$  with  $T$  the absolute temperature,  $R$  the gas constant,  $\psi$  the potential and  $F$  the Faraday number), on solution pH and nature of the acid–base equilibrium that applies at this position.<sup>38,55–57</sup> For the acid–base reactions detailed in eqn (1) and (2), mass action laws corrected for local proton concentration within multi-layered interphases 1 and 2 provide

$$x_0 \leq x \leq x_{N+M+1}: \rho_{\text{fix}}(x, y) = \chi^{(1)} \rho_N h^{(1)}(x, y) + \chi^{(2)} \rho_{j=1} h^{(2)}(x, y) \quad (10)$$

where  $h^{(1)}$  and  $h^{(2)}$  are functions of the position  $x$  and local potential  $y$  according to

$$\begin{aligned} x_0 \leq x: h^{(1)}(x, y) \\ = \sum_{i=1}^{N-1} \{ \beta_i \mu_i(y) - \beta_{i+1} \mu_{i+1}(y) \} f_i(x) + \mu_N(y) f_N(x), \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} x \leq x_{N+M+1}: h^{(2)}(x, y) \\ = \sum_{j=2}^M \{ \beta_j \mu_j(y) - \beta_{j-1} \mu_{j-1}(y) \} f_j(x, H) + \mu_{j=1}(y) f_{j=1}(x, H). \end{aligned} \quad (12)$$

The dimensionless  $\beta_k$  in eqn (11) and (12) are given by  $\beta_{i=1, \dots, N} = \rho_{i=1, \dots, N} / \rho_N$  and  $\beta_{j=1, \dots, M} = \rho_{j=1, \dots, M} / \rho_{j=1}$  where the quantities  $\rho_k = F e_k n_k$  with  $k = i$  or  $k = j$  stand for the maximum charge density reachable within layer  $i$  or layer  $j$  in the limits where ionogenic groups are therein uniformly distributed and completely dissociated. In eqn (11) and (12), the partial dissociation functions  $\mu_k(y)$  for the ionogenic groups located at position  $x$  within layer  $k = i$  and layer  $k = j$  are written as

$$\mu_k(y) = [1 + 10^{-e_k(pK_k - \text{pH})} \exp(\epsilon_k y / z)]^{-1} \quad (13)$$

For a given layer  $k$ , complete dissociation of ionogenic groups is reached at any position  $x$  providing the condition  $\mu_k(y) \rightarrow 1$ , or equivalently  $\varepsilon_k\{pK_k - pH\} \gg 1$ , is satisfied.

## 2.2 Electrostatic interactions between multi-layered interphases in line with Deryagin approximation

**2.2.1 Interaction between soft planar multi-layered interphases.** The electrostatic potential distribution  $y(x)$  between two soft planar multi-layered interphases as defined in Section 2.1 is governed by the non-linearized Poisson–Boltzmann equation written as

$$\begin{aligned} x_0 \leq x \leq x_{N+M+1} : \frac{d^2 y(x)}{dx^2} - \kappa^2 \sinh y(x) \\ = -\kappa^2 \frac{\rho_{\text{fix}}(x, y)}{2F c^\infty z}, \end{aligned} \quad (14)$$

where  $\rho_{\text{fix}}(x, y)$  is given by eqn (10)–(13) and  $\kappa = (2F^2 z^2 c^\infty / \varepsilon_0 \varepsilon_r RT)^{1/2}$  is the reciprocal Debye length with  $\varepsilon_0 \varepsilon_r$  the dielectric permittivity of the medium. We adopt the boundary conditions given by

$$dy(x)/dx|_{x=x_0} = 0 \quad (15)$$

and

$$dy(x)/dx|_{x=x_{N+M+1}} = 0, \quad (16)$$

which express the absence of charge at the core surfaces. Situations where particle 1 carries a surface charge density  $\sigma^{(1)}$  at its core surface are retrieved from our general formalism by setting  $\rho_{i=1} = \sigma^{(1)}/\delta_{i=1}$  and  $\kappa\delta_{i=1} \rightarrow 0$ .<sup>47</sup> Similarly, for a particle 2 carrying a surface charge density  $\sigma^{(2)}$ , we have  $\rho_M = \sigma^{(2)}/\delta_M$  and  $\kappa\delta_M \rightarrow 0$ . The electric component of the disjoining pressure at separation distance  $H$ , denoted as  $\Pi(H)$ , is further written as<sup>1</sup>

$$\Pi(H) = \frac{\kappa^2 \varepsilon_0 \varepsilon_r (RT)}{2} \left( \frac{RT}{zF} \right)^2 \left\{ 2(\cosh y(x_s) - 1) - \left( \frac{dy(x)}{d(\kappa x)} \right) \Big|_{x_s} \right\}^2 \quad (\text{in Nm}^{-2}) \quad (17)$$

where the first and second terms on the rhs are the osmotic and Maxwell stress contributions. In virtue of the principle of mechanical equilibrium for the interacting interphases at a given  $H$ ,  $\Pi(H)$  may be evaluated for any value of  $x_s$  across the overlapped electric double layers with  $x_N \leq x_s \leq x_{N+1}$ .<sup>1</sup> In particular, for the interaction between rigorously identical soft multi-layered interphases (homo-interaction), it is judicious to set  $x_s = x_N + (x_{N+1} - x_N)/2$  because the symmetry of the potential distribution then cancels the Maxwell stress component at this position,<sup>4</sup> thus yielding  $\Pi(H) = \kappa^2 \varepsilon_0 \varepsilon_r [RT/(zF)]^2 (\cosh y_m - 1)$  with  $y_m$  the mid-potential defined by  $y_m = y(x_s = x_N + (x_{N+1} - x_N)/2)$ . The Gibbs electrostatic interaction energy between the planar multi-layered interphases,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}$ , is finally obtained by appropriate integration of  $\Pi$ , *i.e.*

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H) = -\int_{\infty}^H \Pi(H') dH' \quad (\text{in J m}^{-2}) \quad (18)$$

where  $H'$  is a dummy integration variable.

**2.2.2 Interaction between soft multi-layered spherical particles, and between a soft spherical multi-layered particle and a soft planar multi-layered interphase.** The Gibbs energy of

electrostatic interaction at a given separation distance  $H$  between sufficiently large spherical multi-layered particles 1 and 2,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$ , may be obtained from that per unit area of the corresponding planar interphases  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H)$  (eqn (18)) *via*

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H) = -\frac{2\pi R_1 R_2}{R_1 + R_2} \int_{\infty}^H \Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H') dH' \quad (\text{in J}) \quad (19)$$

with  $R_1 = a_1 + \sum_{i=1}^N \delta_i$  and  $R_2 = a_2 + \sum_{j=1}^M \delta_j$ . Eqn (19) is known as the Deryagin equation and is strictly valid when the principal radius of curvature of the particles allows a one dimensional formulation for the electrostatic potential within each layer composing interphases 1 and 2. This treatment is therefore correct for  $\kappa a_1 \gg 1$ ,  $\kappa a_2 \gg 1$ , and it is expected to work very well when separation distance  $H$  is small as compared to curvature radii of particles ( $H \ll R_1$  and  $H \ll R_2$ ). For the electrostatic interaction between a spherical multi-layered particle 1, satisfying  $\kappa a_1 \gg 1$  and  $H \ll R_1$ , and a planar multi-layered interphase 2, the Gibbs energy  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  simply reads

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H) = -2\pi R_1 \int_{\infty}^H \Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H') dH' \quad (\text{in J}) \quad (20)$$

which is the limit of eqn (19) for  $R_2 \rightarrow \infty$ . Within the Debye–Hückel formulation by Ohshima for the electrostatic interaction between soft mono-shell particles,<sup>47</sup> the factor preceding the integral in eqn (19) is set to  $2\pi a_1 a_2 / (a_1 + a_2)$ . This is correct for particles in line with  $R_1 \approx a_1$  and  $R_2 \approx a_2$  but necessarily invalid *e.g.* for core-shell particles where  $a_1 \approx \sum_{i=1}^N \delta_i$ ,  $a_2 \approx \sum_{j=1}^M \delta_j$  and  $\kappa a_1 \gg 1$ ,  $\kappa a_2 \gg 1$ .

**2.2.3 Numerical code.** The set of eqn (1)–(19) was implemented in a Fortran program whose flexibility allows the choice for (i) the number of ion-permeable layers ( $N$  and  $M$ ), (ii) the nature of acid–base equilibrium taking place within layers  $i$  and  $j$ , (iii) the particle core sizes and thickness of various ion-permeable layers involved, (iv) the protolytic features of each layer (sign/magnitude of charge densities,  $pK$  values) and (v) the profile for the concentration of ionogenic groups (parameter  $\alpha_k$ ). For a given separation distance  $H$ , the potential distribution was obtained from the numerical solution of eqn (14)–(16) according to collocation method.<sup>58</sup> Solutions were iteratively obtained for  $H$  values ranging from  $\kappa H \gg 1$  where particles are electrically isolated, down to  $\kappa H = 0.1$ . Solutions for  $\kappa H < 0.1$  may be obtained in the same way as for larger  $\kappa H$ . However their physical relevance becomes questionable due to steric forces between soft multi-layered interphases 1 and 2, as discussed in Section 2.1. Once the potential distribution is determined, the disjoining pressure could be easily evaluated as a function of  $\kappa H$  (eqn (17)) and integrations following eqn (18)–(20) performed by means of Simpson’s method.<sup>59</sup> The validity of the numerical scheme was addressed by comparing results with those obtained from analytical expressions derived for practical limiting situations as detailed below.

**2.2.4 Analytical expressions within Debye–Hückel approximation for some practical limiting situations.** Within the framework of Debye–Hückel approximation which holds for potentials satisfying  $y(x) \ll 1$ , we may write  $\sinh y(x) \approx y(x)$ . Under the further conditions that ionogenic sites are fully

dissociated ( $\mu_k(y) \rightarrow 1$ ) and homogeneously distributed ( $\alpha_k \rightarrow 0$ ) within each layer composing the multi-layered interphases 1 and 2, it may be shown after lengthy algebra that eqn (14)–(16) admit the analytical solution given in ESI† (eqn (S1)–(S3) therein). Linearization of eqn (17) for  $y(x) \ll 1$  further leads to

$$\Pi(H) = \frac{1}{2\kappa^2 \epsilon_0 \epsilon_r} (2Fz c^\infty)^2 \left\{ [y(x_s)]^2 - \left( \frac{dy(x)}{d(\kappa x)} \Big|_{x_s} \right)^2 \right\}. \quad (21)$$

Making use of the potential distribution for  $x_N \leq x \leq x_{N+1}$ , after some developments we obtain for the electrostatic force per unit area between two planar multi-layered interphases,  $\Pi(H)$ , the expression

$$\Pi(H) = \frac{1}{8\kappa^2 \epsilon_0 \epsilon_r} \left\{ \frac{\Omega_+^2}{\sinh^2 \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) / 2 \right]} - \frac{\Omega_-^2}{\cosh^2 \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) / 2 \right]} \right\} \quad (22)$$

where the scalars  $\Omega_\pm$  are defined by

$$\Omega_\pm = \left\{ \sum_{i=2}^{N+1} (\rho_{i-1} - \rho_i) \sinh \left( \kappa \sum_{k=1}^{i-1} \delta_k \right) \pm \sum_{j=1}^M (\rho_j - \rho_{j-1}) \sinh \left( \kappa \sum_{k=j}^M \delta_k \right) \right\} \quad (23)$$

where we pose  $\rho_{N+1} = \rho_0 = 0$ . After integration of  $\Pi(H)$  (eqn (18)), we obtain

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H) = \frac{1}{4\kappa^3 \epsilon_0 \epsilon_r} \left\{ \Omega_+^2 \left\{ \coth \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) / 2 \right] - 1 \right\} - \Omega_-^2 \left\{ 1 - \tanh \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) / 2 \right] \right\} \right\}. \quad (24)$$

Finally, integrating  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H)$  according to eqn (19) provides for  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  the expression

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H) = -\frac{1}{\kappa^4 \epsilon_0 \epsilon_r} \frac{\pi R_1 R_2}{R_1 + R_2} \times \left\{ \Omega_+^2 \left\{ \ln \left[ 1 - \exp \left[ -\kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) \right] \right] \right\} + \Omega_-^2 \left\{ \ln \left[ 1 + \exp \left[ -\kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + \sum_{j=1}^M \delta_j + H \right) \right] \right] \right\} \right\}. \quad (25)$$

In the limit  $N = M = 1$  (soft mono-shell systems), it may be verified that eqn (22)–(25) correctly reduce to the analytical results recently derived by Ohshima.<sup>47</sup> As an additional comment, it is underlined that eqn (22) is of wider applicability than that given

by Tokugawa *et al.*<sup>60</sup> which is strictly valid for the electrostatic interaction between planar homogeneous multi-layers where the thickness of layers  $i = 1$  and  $j = M$  satisfies Donnan condition, i.e.  $\kappa \delta_{i=1} \gg 1$  and  $\kappa \delta_M \gg 1$ . For cases where multi-layered interphases 1 and 2 are rigorously identical (homo-interactions), we have  $N = M$ ,  $\delta_{i=1, \dots, N} = \delta_{j=N+1-i}$ ,  $\rho_{i=1, \dots, N} = \rho_{j=N+1-i}$ ,  $R_1 = R_2 = R$  and eqn (22), (24) and (25) then simplify into

$$\Pi(H) = \frac{1}{2\kappa^2 \epsilon_0 \epsilon_r} \frac{\left\{ \sum_{i=2}^{N+1} (\rho_{i-1} - \rho_i) \sinh \left( \kappa \sum_{m=1}^{i-1} \delta_m \right) \right\}^2}{\sinh^2 \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + H/2 \right) \right]}, \quad (26)$$

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H) = \frac{1}{\kappa^3 \epsilon_0 \epsilon_r} \left\{ \sum_{i=2}^{N+1} (\rho_{i-1} - \rho_i) \sinh \left( \kappa \sum_{m=1}^{i-1} \delta_m \right) \right\}^2 \times \left\{ \coth \left[ \kappa \left( \sum_{i=1}^N \delta_i + H/2 \right) \right] - 1 \right\}, \quad (27)$$

and

$$\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H) = -\frac{2\pi R}{\kappa^4 \epsilon_0 \epsilon_r} \left\{ \sum_{i=2}^{N+1} (\rho_{i-1} - \rho_i) \sinh \left( \kappa \sum_{m=1}^{i-1} \delta_m \right) \right\}^2 \times \ln \left[ 1 - \exp \left[ -\kappa \left( 2 \sum_{i=1}^N \delta_i + H \right) \right] \right], \quad (28)$$

respectively.

Finally, under conditions where  $y(x) \ll 1$  and ionogenic groups are homogeneously distributed within layers  $i$  or  $j$  but partially dissociated ( $\mu_k(y) \neq 1$ ), no simple explicit expressions may be obtained for  $\Pi(H)$ ,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H)$  and  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$ . Instead, semi-analytical formulations are possible as detailed in ESI† (eqn (S4)–(S19) therein).

### 2.3 General expression for the electrostatic interactions between multi-layered particles

**2.3.1 Formulation.** When one or both of the particles depicted in Fig. 1A do not conform to conditions validating Deryagin approximation, rigorous expressions for the Gibbs electrostatic interaction energy are required. To derive such expressions, we start from the result by Verwey and Overbeek who formulated the double layer free energy,  $G_{\text{el}}$ , at charged solid surfaces.<sup>61</sup> Their reasoning was based on a discharging process in the course of which all charges present in the system are decreased at the same rate. Their final result may be written in the form

$$G_{\text{el}} = \int_0^1 \frac{RT}{\nu z F} \left\{ \iiint_V y(\vec{r}, \nu) \rho(\vec{r}, \nu) dV \right\} d\nu \quad (29)$$

where  $\nu$  is a parameter expressing the stage of the discharging process,  $y(\vec{r}, \nu)$  the dimensionless electrostatic potential for a given position  $\vec{r}$  at stage  $\nu$ , and  $V$  the volume where charges are distributed. The quantity  $\rho(\vec{r}, \nu)$  in eqn (29) depends on  $\nu$  and  $y$ , and stands for the density of charges at stage  $\nu$  and position  $\vec{r}$  within volume  $V$ . For soft multi-layered particles,  $\rho(\vec{r}, \nu)$  consists of two contributions, the charge density stemming from mobile ions distributed within/outside the multi-layered

interphases, and that which originates from the partially or completely dissociated ionogenic groups, *i.e.*<sup>62</sup>

$$\rho(\vec{r}, y, \nu) = -\nu\{2zFc^\infty \sinh(\nu y) - \rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y)\}. \quad (30)$$

In addition,  $\rho(\vec{r}, y, \nu)$  is obtained from non-linearized PB equation written as

$$\nabla^2 y(\vec{r}, \nu) = -\frac{zF}{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT} \rho(\vec{r}, y, \nu), \quad (31)$$

where  $\nabla^2$  is the Laplacian operator in spherical geometry  $\nabla^2 \equiv [\partial/\partial r_1(r_1^2 \partial/\partial r_1)]/r_1^2 + [\partial/\partial \theta(\sin \theta \partial/\partial \theta)]/(r_1^2 \sin \theta)$ , recalling that the problem is independent of the azimuthal angle, and  $(r_1, \theta)$  is defined in Fig. 1A. Boundaries associated to eqn (31) express zero value for the potential gradient at the core surface of particles 1 and 2, in line with the absence there of charges. Once the potential distribution is obtained *via* appropriate solving of eqn (30) and (31) (see details in Section 2.3.2), the double layer interaction energy  $\Delta G_{\text{el}}$  is simply provided by

$$\Delta G_{\text{el}} = G_{\text{el}}(H) - G_{\text{el}}(H \rightarrow \infty). \quad (32)$$

For the interaction between two spherical multi-layered particles ( $\Delta G_{\text{el}} \equiv \Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$ ),  $\rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y)$  in eqn (31) is given by

$$\rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y) = \chi^{(1)} \rho_N h^{(1)}(r_1, \nu y) + \chi^{(2)} \rho_j =_1 h^{(2)}(r_2, \nu y) \quad (33)$$

where  $h^{(1)}$  and  $h^{(2)}$  are defined by eqn (11) and (12) and the therein involved functions  $f_{i=1, \dots, N}$  and  $f_{j=1, \dots, M}$  are now depending on the radial coordinates  $r_1$  and  $r_2$  defined in Fig. 1A according to

$$f_{i=1, \dots, N}(r_1) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \frac{r_1 - a_1 - \sum_{k=1}^i \delta_k}{\alpha_i} \right] \right\} \quad (34)$$

and

$$f_{j=1, \dots, M}(r_2, H) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \frac{r_2(H) - a_2 - \sum_{k=1}^{M+1-j} \delta_{M+1-k}}{\alpha_j} \right] \right\}. \quad (35)$$

where  $r_2$  depends on  $H$  *via*

$$r_2 = \{(R_1 + R_2 + H)^2 + r_1^2 - 2r_1(R_1 + R_2 + H)\cos \theta\}^{1/2}, \quad (36)$$

and  $(r_1, \theta)$  the polar coordinate system for particle 1 as specified in Fig. 1A.

For the interaction between a spherical multi-layered particle 1 and a planar multi-layered interphase 2 ( $\Delta G_{\text{el}} \equiv \Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$ ),  $\rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y)$  is yielded by

$$\rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y) = \chi^{(1)} \rho_N h^{(1)}(r_1, \nu y) + \chi^{(2)} \rho_j =_1 h^{(2)}(x, \nu y), \quad (37)$$

where  $f_{i=1, \dots, N}$  is given by eqn (34),  $f_{j=1, \dots, M}$  by eqn (7a and b) with  $x$  the dimension defined in Fig. 1B. It is straightforward to verify that  $x$  and  $r_1$  are then coupled *via* the relationship

$$x = r_1 \cos \theta - a_1. \quad (38)$$

For the sphere/sphere interaction configuration, it should be emphasized that the potential distributions at  $\kappa H \rightarrow \infty$

around the isolated particles 1 and 2 have spherical symmetry, so that the  $\theta$ -dependent part of  $\nabla^2$  may be omitted in this  $\kappa H$ -range. However, when reducing  $\kappa H$ , situations may arise where spherical symmetry for the potential profiles around each particle is lost. This is typically the case for high charge density  $\rho_{\text{fix}}(\vec{r}, \nu y)$  and/or low electrolyte concentrations, *i.e.* situations where Debye–Hückel approximation becomes questionable. In line with this argument which will be concretely illustrated in Section 3.2, Ohshima and Kondo correctly argued in ref. 50 that for the interaction between homogeneous porous particles of charge density in agreement with linearization of PB equation, it is sufficient to consider the only radial term of the  $\nabla^2$  operator. For interactions between multi-layered spherical particles where  $y(\vec{r}, \nu) \ll 1$ , and under the further conditions that ionogenic groups are fully dissociated and layers are homogeneous ( $\alpha_k \rightarrow 0$ ), we may show that eqn (29) then reduces to

$$G_{\text{el}} = \frac{RT}{2zF} \left\{ \sum_{i=1}^N \iiint_{V_i} \rho_i y_i(\vec{r}) dV_i + \sum_{j=1}^M \iiint_{V_j} \rho_j y_j(\vec{r}) dV_j \right\}, \quad (39)$$

where  $y_k$  and  $V_k$  are the potential distribution and volume within/of layers  $k = i$  and  $k = j$  in multi-layered interphases 1 and 2, respectively. Under the strict condition  $y(\vec{r}, \nu) \ll 1$ , eqn (39) extends the expression given by Ohshima for homogeneous porous particles<sup>50</sup> to the general situation of multi-layered particles that may be entirely porous, hard or composed of a core and a multi-layered shell. In eqn (39),  $y_k(\vec{r})$  are obtained *via* solution of eqn (30) and (31) with setting  $\nu = 1$ ,  $\sinh(y) \approx y$  and  $\nabla^2 \equiv [\partial/\partial r_1(r_1^2 \partial/\partial r_1)]/r_1^2$ , in line with arguments given above on the neglect of angular term in Laplacian operator within Debye–Hückel treatment.

**2.3.2 Numerical resolution.** For the interaction situations outlined in Section 2.3.1 where two-dimensional formulation for the potential distribution across the multi-layered interphases is required, eqn (30) and (31), (33) (sphere/sphere interaction) or eqn (30) and (31), (37) (sphere/plate interaction) were solved using numerical codes developed within Comsol Multiphysics (version 3.4, Comsol AB, Sweden) and written for the sake of convenience in axi-symmetric cylindrical geometry (see ESI† for details). We employed an affined invariant form of the damped Newton method applied to the discretized equivalent of the equations appropriately linearized according to the linearization point strategy, as described elsewhere.<sup>43</sup> The governing equations were then discretized on a non-uniform mesh grid with a large density of points within the soft component of the particles and in their close vicinity. For the given protolytic properties and geometry of the multi-layered soft systems, numerical solutions for  $y(\vec{r}, \nu)$  and  $\rho(\vec{r}, y, \nu)$  were obtained for various values of  $\nu = \nu_q$  with  $0 < \nu_q =_1, \dots, Q \leq 1$  and  $Q$  an integer much larger than 1. This procedure was repeated for different separation distances ranging from  $\kappa H \rightarrow \infty$  to  $\kappa H = 0.1$ . Then, the volume integral involved in eqn (29) was evaluated for a given  $\nu = \nu_q$  using standard numerical integration technique. Integral over the variable  $\nu$  in eqn (29) could be

subsequently performed by means of trapeze method.<sup>59</sup> Last,  $\Delta G_{\text{el}}$  was computed according to eqn (32). We systematically verified that the obtained results were independent of the size of the simulation box, local density of grid points and value of  $Q$  (convergence is largely reached for typical values of  $Q \approx 400$ ). The precision on the potential was set to a few percent of a mV and consistency of the numerical scheme was further verified upon comparison with (i) numerical results/analytical equations derived under conditions specified in Section 2.2 and (ii) predictions from eqn (39). Note that the time required for the computation of  $\Delta G_{\text{el}}$  via eqn (29)–(32) ( $\sim$  a few hours with a PC 3.5GB RAM) is significantly larger than that ( $\sim$  few seconds) for systems obeying the conditions marking the validity of Deryagin approach.

### 3. Results and discussion

The flexibility of our formalism in terms of system geometry (sphere/plate, sphere/sphere, plate/plate interactions), dissociation features of ionogenic groups, number and diffuseness of ion-permeable layers renders impossible any exhaustive listing of results that would cover all possibilities offered by theory. In this section, we rather describe few illustrative situations where electrostatic interaction takes place between spherical multi-layered particles which comply with the conditions dictated by Deryagin approach (Section 3.1). In Section 3.2, the interaction between soft spherical multi-layered particles that require exact formulation of Gibbs electrostatic interaction energy is considered. Within the range of ionic strengths investigated (1 mM to 100 mM), we verified that the rigorous Gibbs electrostatic interaction energy for the systems tackled in Section 3.1 is excellently approximated—within 3% error at most (reached at 1 mM and  $\kappa H = 0.1$ )—by that obtained following Deryagin formulation.

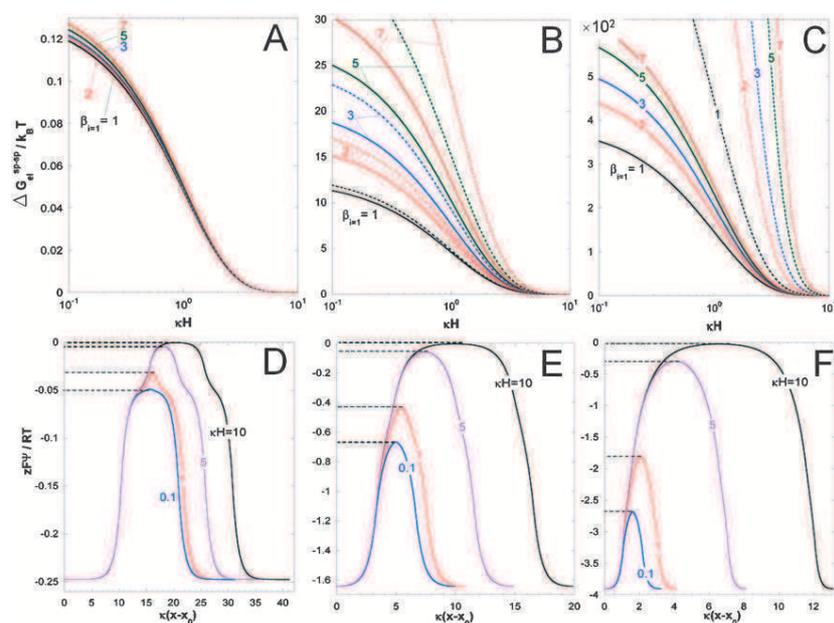
#### 3.1 Case of large scale multi-layered particles in line with Deryagin treatment

**3.1.1 Homo-interactions.** As a starting point, we consider the electrostatic homo-interaction between two identical multi-layered spherical particles with  $N = M = 2$ ,  $\delta_{i=1} = \delta_{j=2} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $a_1 = a_2 = 300$  nm. The ionogenic groups are fully dissociated, negatively charged ( $\epsilon_k = -1$ ) and there is homogeneous distribution of soft material within each layer ( $\alpha_k \rightarrow 0$ ). Results for the  $H$ -dependence of  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  are shown in Fig. 2 for various electrolyte concentrations  $c^\infty$  as a function of the ratio  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} (= \beta_{j=2})$  with  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM. The numerical results obtained as detailed in Section 2.2.3 were further compared with predictions from eqn (28). Unsurprisingly, the interactions between the two identical particles are systematically repulsive so that  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H) > 0$  for any values of  $c^\infty$  and  $\beta_{i=1}$ . For given  $\beta_{i=1}$  and  $\kappa H$ ,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  decreases with increasing  $c^\infty$ , which is in line with an increase of the screening of charges embedded within the multi-layered interphases, by ions present in the medium. Upon increase of  $\beta_{i=1}$  at fixed  $c^\infty$ , that is when increasing the magnitude of charge density of the most internal particle layers, repulsion between the particles becomes more important and  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  increases. At large ionic strengths (Fig. 2A) where the magnitude

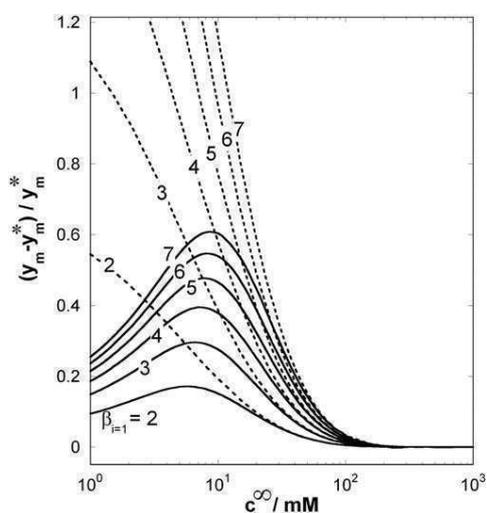
of local potentials validates Debye–Hückel approximation (Fig. 2D), exact match between numerical and analytical results is met. For decreasing  $c^\infty$ , discrepancies between the two become significant with eqn (28) that increasingly overestimates  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$ . The striking feature is that at large  $c^\infty$ , an increase of the charge density within the most internal particle layers modifies  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  to a small extent only. On the contrary, for a given  $\kappa H$ , the increase of  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  with  $\beta_{i=1}$  becomes significant with decreasing  $c^\infty$  and it is most pronounced when particles are in close vicinity. This result basically means that the interaction is increasingly impacted by the potential distributions within layers  $i = 1$  and  $j = 2$  when the thickness of the most external layers ( $i = 2$  and  $j = 1$ ) becomes comparable or lower than the Debye length  $\kappa^{-1}$  and/or when  $\kappa H$  is small. Under such conditions, electric double layers extend significantly within layers  $i = 1$  and  $j = 2$ , which in turn affects the therein electric field profiles. This is confirmed by the potential distributions given in Fig. 2D–F at various  $c^\infty$  and  $\kappa H$  for  $\beta_{i=1} = 5$ . In detail, all potential profiles are symmetrical with respect to the position half the separation distance, which is typical of homo-interactions.<sup>4</sup> Upon decrease of  $\kappa H$ , local electrostatic potentials increase (in magnitude) within the region where electric double layers overlap. In line with the comments given above on the respective contributions of each layer in determining  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$ , it is noted that at 100 mM and large  $\kappa H$ , the potential distribution exhibits a ‘two-waves’ profile within/around particle 1 (similarly for particle 2). This is reminiscent of the two-layers structure adopted for multi-layered interphase 1. Upon decrease of  $\kappa H$  and/or decrease of  $c^\infty$ , this ‘two-waves’ profile gradually disappears and leaves place for a parabolic-like distribution across the region where electric double layers overlap, thereby denoting an increased contribution of layers  $i = 1$  and  $j = 2$  for  $\kappa\delta_{i=2} \ll 1$  and  $\kappa\delta_{j=1} \ll 1$ .

In ref. 60, Tokugawa *et al.* discussed the respective contributions of planar layers composing multi-layered membranes on their overall electrostatic interaction features, *albeit* within the restricted Debye–Hückel approximation and Donnan condition for the most internal layers. They argued that the disjoining pressure for this system was basically affected by the potential distribution in ‘layers located within the depth  $\kappa^{-1}$  from the membrane surface’. This conclusion is in agreement with the results of Fig. 2 obtained from a rigorous treatment of electrostatics. Closer inspection of the dependence of the mid-potential  $y_m$  with respect to  $c^\infty$  and  $\beta_{i=1}$  under conditions of Fig. 2 reveals that the contribution of the most internal layers to  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  is not continuously growing when decreasing  $c^\infty$ , *i.e.* when decreasing  $\kappa\delta_{i=2}$  and  $\kappa\delta_{j=1}$ . This is shown in Fig. 3 where the ratio  $(y_m - y_m^*)/y_m^*$  is plotted as a function of  $c^\infty$  and  $\beta_{i=1}$  at  $\kappa H = 0.5$  with  $y_m^*$  the mid-potential evaluated for  $\beta_{i=1} = 1$ . At fixed  $\beta_{i=1}$ , this ratio exhibits a maximum for a threshold value of  $c^\infty$ . The presence of this maximum is intrinsically due to the non-linearity of the PB equation, as verified by comparing the results with those obtained within Debye–Hückel approximation (Fig. 3).

In Fig. 4A, the homo-interaction situation commented above is further analyzed for  $\beta_{i=1} = 5$ ,  $c^\infty = 1$  mM,  $\delta_{i=1} = 10$  nm and various thicknesses  $\delta_{i=2}$  of the external



**Fig. 2** Homo-interaction Gibbs energy between two (identical) soft multi-layered particles in 100 mM (panel A), 10 mM (panel B) and 1 mM (panel C) bulk electrolyte concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various ratios  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} (= \rho_{j=2}/\rho_{j=1})$  (indicated). Plain lines: numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Dashed lines: analytical predictions based on eqn (28). Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = M = 2$ ,  $\delta_{i=1} = \delta_{j=2} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM, all  $\varepsilon = -1$ , all  $\alpha \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . (D–F) Dimensionless potential distribution (issued from non-linearized Poisson–Boltzmann equation) from the core surface of particle 1 to that of particle 2 under conditions of panels A–C with  $\beta_{i=1} = 5$  for various  $\kappa H$  (indicated) and  $c^\infty = 100$  mM (panel D), 10 mM (panel E) and 1 mM (panel F).



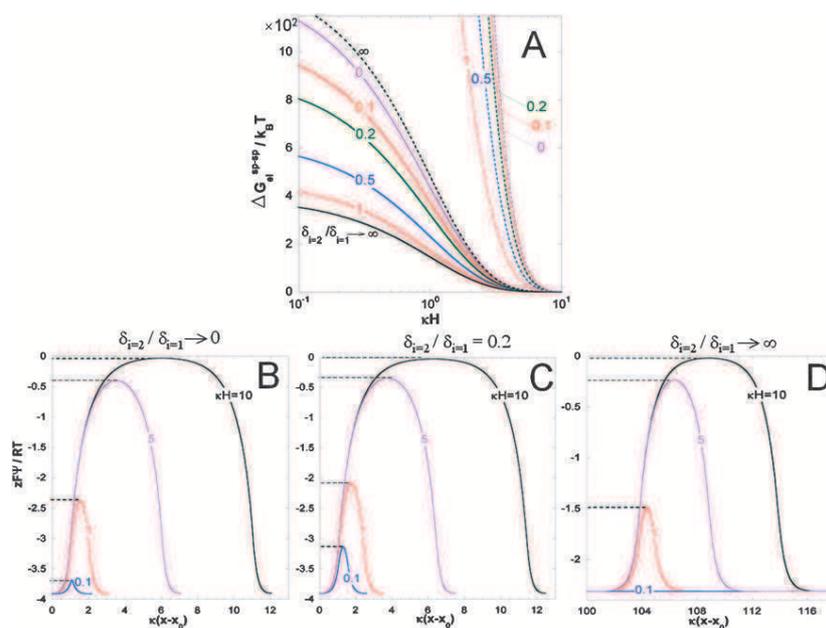
**Fig. 3** Ratio  $(y_m - y_m^*)/y_m^*$  as a function of bulk electrolyte concentration  $c^\infty$  at various values of  $\beta_{i=1}$  (indicated) for  $\kappa H = 0.5$  under conditions of Fig. 2. Plain and dashed lines are results obtained from non-linearized and linearized Poisson–Boltzmann equations, respectively. See text for further details.

layer of particle 1. In agreement with results of Fig. 2,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}(H)$  is strongly impacted by  $\delta_{i=2}$  for such a value of  $c^\infty$ . In detail, when increasing  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$ ,  $\kappa\delta_{i=2}$  increases and the interaction becomes significantly governed by the layer positioned within length  $\kappa^{-1}$  from the surface, *i.e.* the outer layer  $i = 2$ . Because  $\beta_{i=1} > 1$ , local potentials within layer  $i = 2$  are necessarily lower (in magnitude) than those in layer

$i = 1$  (Fig. 4B–D) so that, in turn,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  decreases with increasing  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  at fixed  $\kappa H$ . In the limit  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} \rightarrow \infty$ ,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}(H)$  is exclusively determined by the electrostatic properties of layer  $i = 2$ . This limit corresponds to Donnan partitioning of ions across the interphase extending from bulk of layer  $i = 2$  to outer electrolyte solution (Fig. 4D). Under such conditions, the potential profiles within layer  $i = 1$  and in bulk of layer  $i = 2$  are not affected upon decrease of  $\kappa H$ . This limiting situation corresponds to a ‘Donnan-potential regulated’ interaction, terminology introduced earlier by Ohshima.<sup>62</sup> Fig. 4A further shows that estimations of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  from eqn (28) poorly reproduce the exact numerical results and thereby erroneously quantify the respective contributions of each layer on  $\Delta G_{el}^{sp-sp}(H)$ .

From the above commented dependence of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}(H)$  on  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  and  $c^\infty$ , we anticipate that the Gibbs energy of electrostatic interactions between identical bacteria covered by surface appendages of few hundreds of nm (*e.g.* LPS or capsule) is solely determined by details of the potential distribution within the most external part of the bacteria only. This is true for ionic strengths as low as 1 mM. On the contrary, if the bacterial surface appendages are few nm thick,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  will then be strongly affected not only by the electrostatic features of the external part of the bacteria but also by their most internal peripheral organizations, which include the cell wall.

**3.1.2 Hetero-interactions.** We now examine electrostatic interactions between dissimilar soft particles. The analysis is still restricted to homogeneous layers and complete

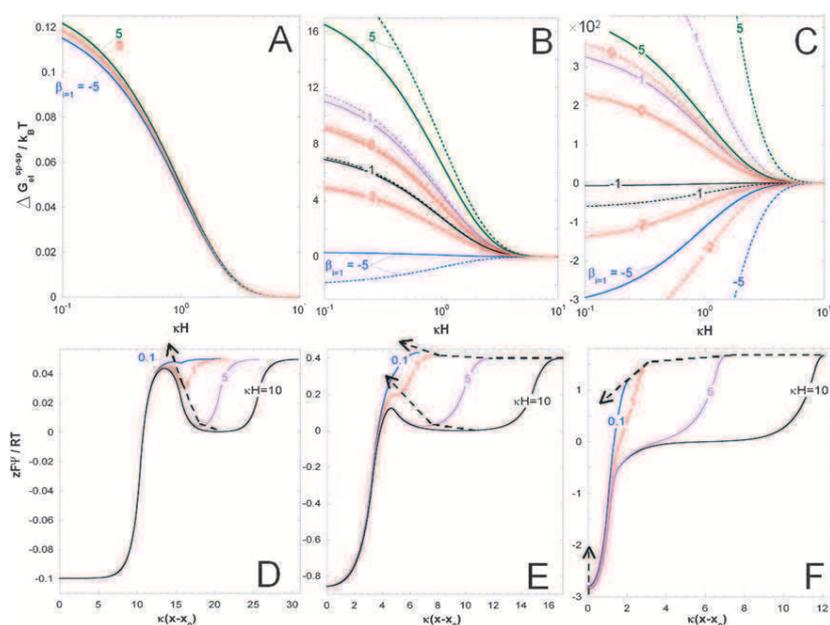


**Fig. 4** (A) Homo-interaction Gibbs energy between two (identical) soft multi-layered particles in 1 mM bulk electrolyte concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various ratios  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  ( $=\delta_{j=1}/\delta_{j=2}$ ). Plain lines: numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Dashed lines: analytical predictions based on eqn (28). Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = M = 2$ ,  $\delta_{i=1} = \delta_{j=2} = 10$  nm,  $\beta_{i=1} = \beta_{j=2} = 5$ ,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM, all  $\varepsilon = -1$ , all  $\alpha \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . (B–D) Dimensionless potential distribution (issued from non-linearized Poisson–Boltzmann equation) from the core surface of particle 1 to that of particle 2 under conditions of panel A for various  $\kappa H$  (indicated) and various ratios  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  (indicated).

dissociation of ionogenic groups, with  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\delta_{i=1} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM and  $\varepsilon_{i=2} = \varepsilon_{j=1} = 1$ . The dependence of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  on  $\kappa H$  is given in Fig. 5 for  $c^\infty = 100$ , 10 and 1 mM as a function of the ratio  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2}$  which reflects the magnitude and sign of the charge density within internal layer  $i = 1$  of particle 1. For  $c^\infty = 100$  mM,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  is nearly independent of  $\beta_{i=1}$  and remains essentially determined by the electrostatic repulsion between layer  $i = 2$  of particle 1 and  $j = 1$  of particle 2 (case  $\kappa\delta_{i=2} \gg 1$ , see analogy with Fig. 2A). Only at very small separation distances, internal layer  $i = 1$  modestly impacts  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$ . In detail, the above repulsion is somewhat reduced when layer  $i = 1$  carries a negative charge ( $\beta_{i=1} < 0$ ), whereas it is slightly enhanced for  $\beta_{i=1} > 0$ . Upon decrease of  $c^\infty$ ,  $\kappa\delta_{i=2}$  decreases and the trends commented for  $c^\infty = 100$  mM are magnified.  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  then becomes increasingly affected by details of the potential distribution within layer  $i = 1$  so that particle interaction may become attractive for sufficiently negative  $\beta_{i=1}$ . At  $c^\infty = 100$  mM, excellent agreement is met between  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  evaluated according to eqn (25) and that obtained *via* the numerical methodology detailed in Section 2.2.3. This is in agreement with the magnitude of the corresponding local potentials across the interacting multi-layered interphases (Fig. 5D). Similarly to homo-interactions, discrepancies arise for decreasing  $c^\infty$ . However, the major difference is that for hetero-interactions, analytical expressions based on Debye–Hückel approximation may now fail in reproducing adequately the sign of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$ . In particular, for  $\beta_{i=1} = -5$  and  $c^\infty = 10$  mM, the magnitude of the local potentials within the negatively charged layer  $i = 1$  of particle 1 is necessarily over-estimated with the

use of linearized PB equation. In turn, analytical results suggest attractive particle interaction whereas rigorous treatment of electrostatics points out an interaction of opposite sign. This clearly emphasizes the severe limits of Debye–Hückel approximation when applied to the formulation of electrostatic interaction between soft multi-layered particles.

In Fig. 5D–F, potential distributions at 100 mM, 10 mM and 1 mM electrolyte concentrations are shown for  $\beta_{i=1} = -2$  and various  $\kappa H$  under conditions of Fig. 5A–C. The dissimilarity of the interacting particles is now clearly reflected in the potential distributions. For  $c^\infty = 100$  mM, Donnan conditions apply to layers  $i = 1$  and  $j = 1$ . Upon double layer overlap, the Donnan potentials of these layers remain unaffected while potentials within layer  $i = 2$  and across the double layer overlap region increase, thus giving rise to particles repulsion. At 10 mM, the requirements for Donnan partitioning in layers  $i = 1$  and  $j = 1$  are not satisfied, as judged from the non-zero value of the electric field at  $x = x_0^+ = 0^+$  and  $x = x_{N+M+1}^-$ . When reducing  $\kappa H$ , potentials within layer  $i = 1$  remain basically unaffected while those within layer  $i = 2$  and in the double layer overlap region increase. The new feature is that the potential at the core surface of particle 2 now also increases essentially because  $\kappa\delta_{j=1} \approx 1$ . The resulting picture is that of a repulsive interaction between particles. At 1 mM, electric double layer significantly extends with the most internal layer  $i = 1$  of particle 1 and attraction sets in upon particles approach. This is mainly due to the interaction between layers  $i = 1$  and  $j = 1$  that carry charges of opposite signs for  $\beta_{i=1} = -2$ . Such attraction is typically manifested by a concomitant decrease



**Fig. 5** (A–C) Hetero-interaction Gibbs energy between two soft particles in 100 mM (panel A), 10 mM (panel B) and 1 mM (panel C) bulk electrolyte concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various ratios  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2}$ . Plain lines: numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Dashed lines: predictions from analytical eqn (25). Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\delta_{i=1} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\epsilon_{i=2} = \epsilon_{j=1} = 1$ , all  $\alpha \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . (D–F) Dimensionless potential distribution (issued from non-linearized Poisson–Boltzmann equation) from the core surface of particle 1 to that of particle 2 under conditions specified in panels A–C with  $\beta_{i=1} = -2$  at various  $\kappa H$  (indicated) and  $c^\infty = 100$  mM (panel D), 10 mM (panel E) and 1 mM (panel F).

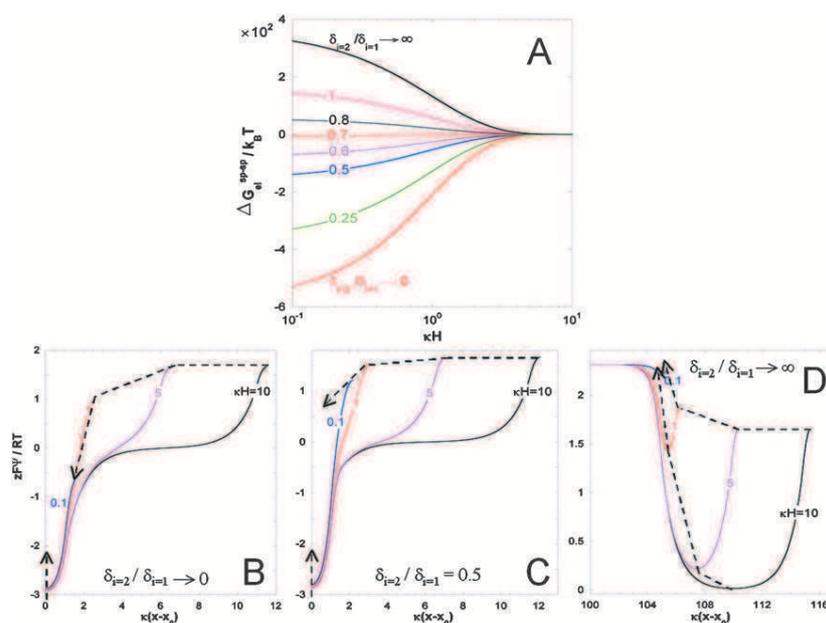
(in magnitude) of the core surface potentials of particles 1 and 2 when reducing  $\kappa H$ .

From Fig. 5, it follows that the respective contributions of the various layers in determining both magnitude and sign of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  are strongly dependent on the salt content in the medium. By the same token, it is anticipated that for a given  $c^\infty$ ,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  is critically determined by the ratio between the thicknesses of layers within a given multi-layered interphase. This is illustrated in Fig. 6 where  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  is plotted *versus*  $\kappa H$  for different  $\delta_{i=2}$ , the situation considered being that of Fig. 5 with  $\beta_{i=1} = -2$  and  $c^\infty = 1$  mM. For  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} \rightarrow \infty$ ,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  is solely governed by the repulsion between layer  $i = 2$  of particle 1 and layer  $j = 1$  of particle 2. In the other limit where  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} \rightarrow 0$ ,  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  is negative and this attraction is exclusively caused by electrostatic forces exerted between the oppositely charged layers  $i = 1$  and  $j = 1$ . For decreasing values of  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  between these two limits, the overall particle interaction gradually passes from repulsion to attraction, thereby pointing out an increased contribution of layer  $i = 1$ . For the sake of completeness, potential profiles for  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} \rightarrow \infty$ ,  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} = 1/2$  and  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1} \rightarrow 0$  are reported in Fig. 6B–D for various  $\kappa H$  and 1 mM electrolyte concentration. The attractive or repulsive nature of the interaction is marked by characteristic evolutions of the potential distributions with  $\kappa H$  as commented in Fig. 5.

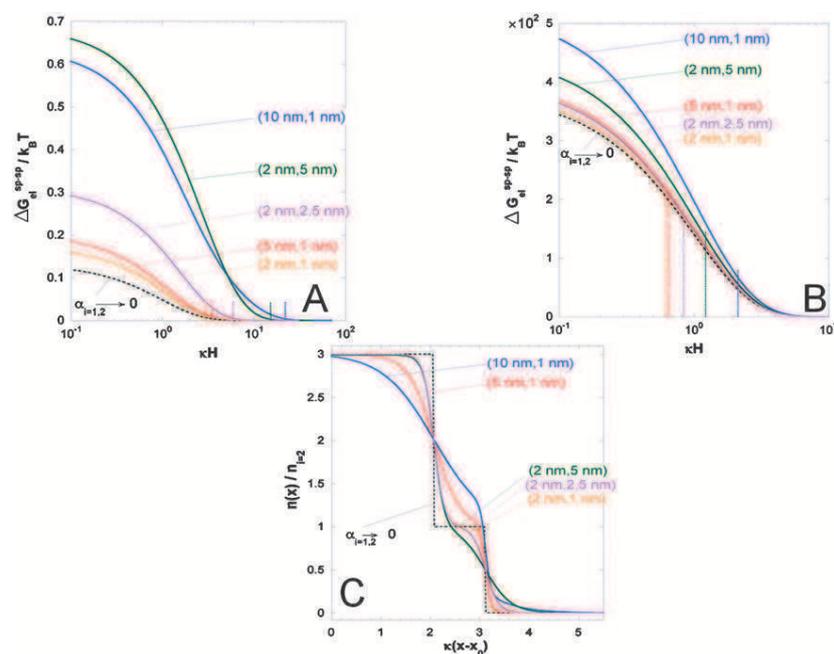
In Fig. 7, we briefly illustrate the impact of heterogeneous distributions of ionogenic groups within a given layer of the multi-layered interphase 1. To simplify the discussion, we adopt the model parameters  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\beta_{i=1} = 3$ ,  $\delta_{i=1} = 20$  nm,  $\delta_{i=2} = 10$  nm,  $\delta_{j=1} = 5$  nm,  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\epsilon_{i=2} = \epsilon_{j=1} = 1$  and  $\alpha_{j=1} \rightarrow 0$ ,

so that all layers are positively charged and the heterogeneity in distribution of completely dissociated ionogenic groups pertains to layers composing the multi-layered interphase 1 only. The considered distributions are shown in Fig. 7C where the quantity  $n(x)/n_{i=2}$  is plotted for various sets of  $\alpha_{i=1}$  and  $\alpha_{i=2}$ . The corresponding dependence of  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  on  $\kappa H$  is shown in Fig. 7A and B for  $c^\infty = 100$  mM and  $c^\infty = 1$  mM, respectively. Also, in line with the discussion given in Section 2.1.1, we systematically indicated the minimum  $\kappa H$  value that conforms to the conditions of non-overlap of the diffuse tail of interphase 1 with the layer  $j = 1$  of particle 2. This value corresponds to the position  $x$  where  $n(x)$  is only one percent of the ionogenic group concentration reached in layer  $i = 1$  at  $x = x_0 = 0$ . Upon expansion of the multi-layered interphase 1 toward the electrolyte side, *i.e.* with increasing  $\alpha_{i=1}$  and/or  $\alpha_{i=2}$ , the repulsive electrostatic interactions between the particles within the relevant  $\kappa H$  range are basically suppressed as compared to the situation where  $\alpha_{i=1} \rightarrow 0$  and  $\alpha_{i=2} \rightarrow 0$ . This suppression is quasi-complete at 100 mM while some repulsion persists at 1 mM. In the latter situation, for a given  $\kappa H$  at fixed  $\alpha_{i=1}$ , repulsion slightly increases when increasing the length of the diffuse tails of multi-layered interphase 1, *i.e.* upon increase of  $\alpha_{i=2}$ . This is due to the corresponding local increase of concentration of charged ionogenic groups as accompanied by that of local electrostatic potentials.

The main feature underlined by results of Fig. 7 is that a soft particle may easily attach to another particle or substratum by deploying its soft surface component in such a manner that it crosses partially or completely the unfavorable electrostatic energy barrier which it could not cross otherwise. Note that this deployment and subsequent electrostatic energy barrier



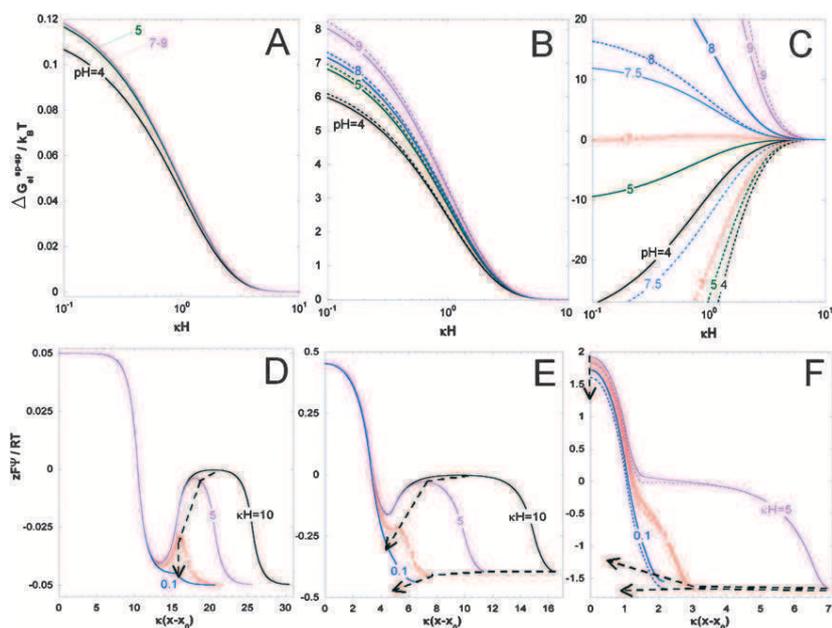
**Fig. 6** (A) Hetero-interaction Gibbs energy between two soft particles in 1 mM electrolyte bulk concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various ratios  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$ . Results stem from numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\delta_{i=1} = 10$  nm,  $\delta_{j=1} = 5$  nm,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} = -2$ ,  $\epsilon_{i=2} = \epsilon_{j=1} = 1$ , all  $\alpha \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . (B–D) Dimensionless potential distribution (issued from non-linearized Poisson–Boltzmann equation) from the core surface of particle 1 to that of particle 2 for various values of  $\kappa H$  (indicated) and various ratios  $\delta_{i=2}/\delta_{i=1}$  (indicated) under conditions of panel A.



**Fig. 7** Hetero-interaction Gibbs energy between two soft particles in 100 mM (panel A) and 1 mM (panel B) electrolyte bulk concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various decay lengths  $\alpha_{i=1,2}$  of the ionogenic site concentration distributions within layer 1 and layer 2 of particle 1. The notation e.g. (2 nm, 1 nm) should be read as ( $\alpha_{i=1} = 2$  nm,  $\alpha_{i=2} = 1$  nm). Results stem from numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. The vertical dashed lines mark the values of  $\kappa H$  where there is overlap between the diffuse interphases of the interacting particles. Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\delta_{i=1} = 20$  nm,  $\delta_{i=2} = 10$  nm,  $\delta_{j=1} = 5$  nm,  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} = 3$ ,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\epsilon_{i=2} = \epsilon_{j=1} = 1$ ,  $\alpha_{j=1} \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . (C) Spatial distribution for the concentration of ionogenic groups normalized with respect to  $n_{i=2}$  across the interphase of particle 1 for the various sets of values ( $\alpha_{i=1}$ ,  $\alpha_{i=2}$ ) adopted in panels A and B.

bypass may be driven by biological processes in the case of bioparticles but also be the result of swelling in response to

osmotic stress. The soft particle then gets closer to the target surface and short-range attractive interaction or specific



**Fig. 8** (A–C) Hetero-interaction Gibbs energy between two soft particles in 100 mM (panel A), 10 mM (panel B) and 1 mM (panel C) electrolyte bulk concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$  for various pH values (indicated). Plain lines: numerical simulations based on non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Dashed lines: predictions from semi-analytical expressions given in ESI.† Model parameters:  $a_1 = a_2 = 300$  nm,  $N = 2$ ,  $M = 1$ ,  $\delta_{i=1} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $n_{i=1} = n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\varepsilon_{i=1} = 1$ ,  $\varepsilon_{i=2} = \varepsilon_{j=1} = -1$ , all  $\alpha \rightarrow 0$ ,  $\mu_{j=1} \rightarrow 1$ ,  $pK_{i=1} = 9$ ,  $pK_{i=2} = 3$ ,  $z = 1$ . (D and E) Dimensionless potential distribution (issued from non-linearized Poisson–Boltzmann equation) from the core surface of particle 1 to that of particle 2 under conditions specified in panels A–C for various values of  $\kappa H$  (indicated) and  $c^\infty = 100$  mM (panel D) and 10 mM (panel E). Panel F: as in panels D and E with electrolyte concentration 1 mM, pH = 4 (plain lines) and pH = 7 (dashed lines).

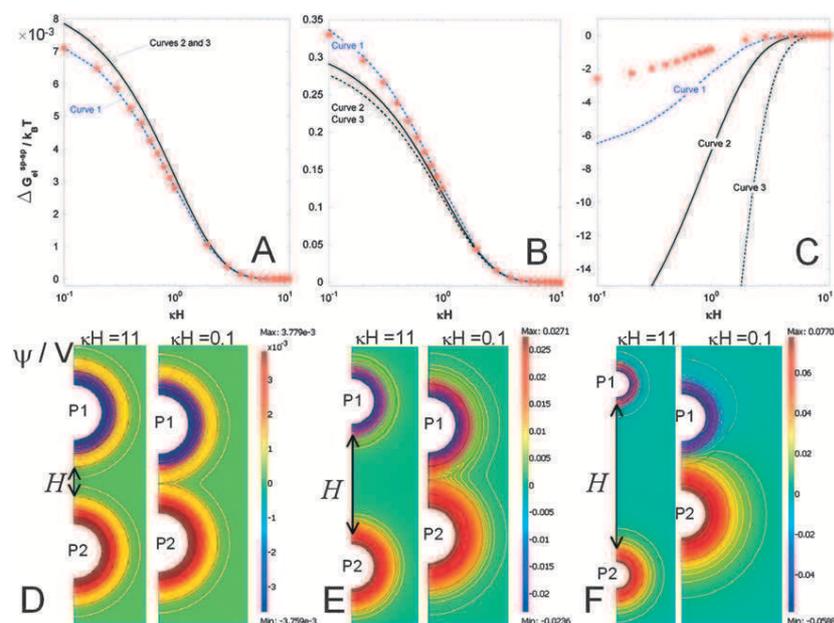
interactions may take the relay for effective adhesion/deposition. The above processes, though intuitively anticipated by several authors,<sup>54</sup> may be apprehended on a quantitative basis by means of the here-reported theory. Finally, for multi-layered particles exhibiting position-dependent charge distributions within their most internal layers only, the way these inner heterogeneities impact  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  depends on whether or not they affect the potential distribution located within the part of the multi-layered interphases which are operative in governing  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  (not shown).

As a final illustration of hetero-interaction within Deryagin approximation, we report in Fig. 8 the Gibbs energy of electrostatic interaction between two soft particles ( $N = 2$ ,  $M = 1$ ) in 100 mM, 10 mM and 1 mM electrolyte bulk concentration as a function of solution pH. The ionogenic sites carried by particle 2 are fully dissociated and negatively charged, while partial dissociation for the ionizable sites embedded within layers  $i = 1, 2$  of particle 1 is now considered with  $\varepsilon_{i=1} = 1$ ,  $pK_{i=1} = 9$  and  $\varepsilon_{i=2} = -1$ ,  $pK_{i=2} = 3$ . Particles geometry and total concentration of ionogenic groups are further defined by  $n_{i=1} = n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\delta_{i=1} = 10$  nm,  $\delta_{i=2} = \delta_{j=1} = 5$  nm,  $\alpha_k \rightarrow 0$ ,  $a_1 = a_2 = 300$  nm. Overall, results are qualitatively analogous to those commented in situations where ionogenic groups are fully dissociated (Fig. 5). At 100 mM, the interaction is mainly conditioned by the repulsive interaction between layers  $i = 2$  and  $j = 1$ . Upon increase of pH, charge density within layer  $i = 2$  is increasingly negative (eqn (1)) so that for a given  $\kappa H$ ,

repulsion increases and reaches a maximum for  $\text{pH} \gg 3$  where full dissociation of groups in layer  $i = 2$  is achieved. Upon decrease of  $c^\infty$ , the protolytic features of layer  $i = 1$  interfere significantly with those of layer  $i = 2$  in determining  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$ . In detail, a decrease of pH increases the density of positive charges carried by layer  $i = 1$  so that for sufficiently low values of  $c^\infty$  where  $\kappa\delta_{i=2} < 1$ ,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  becomes negative as a result of the predominant attraction between layers  $i = 1$  and  $j = 2$ . For some pH values,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  may even exhibit a shallow maximum as a function of  $\kappa H$ , which reflects that the respective contributions of layers  $i = 1, 2$  in determining magnitude and sign of  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  is a function of separation distance. The potential profiles depicted in Fig. 8D–F for pH = 4 and pH = 7 for various  $\kappa H$  corroborate the above comments. Finally, estimations of  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  issued from the semi-analytical approach described in ESI† are excellent to reasonable for  $c^\infty = 100$  mM and  $c^\infty = 10$  mM if compared to exact numerical results. They become however extremely poor in the low ionic strength regime (both with respect to sign and magnitude of interaction energy) where potential distribution within most internal layer of particle 1 affects significantly  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$ .

### 3.2 Limitations of Deryagin treatment as compared to general formulation of electrostatic interactions between soft multi-layered particles

In this section, we give a quantitative comparison between  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}$  evaluated rigorously *via* the numerical strategy detailed



**Fig. 9** Hetero-interaction Gibbs energy between two soft particles in 100 mM (panel A), 10 mM (panel B) and 1 mM (panel C) electrolyte bulk concentration as a function of normalized interdistance  $\kappa H$ . Symbols are issued from rigorous evaluation of the interaction energy taking into account the curvature of the potential distribution within/outside the particles (eqn (29), (32) and resolution of 2D non-linear Poisson–Boltzmann (PB) eqn (30) and (31)). Curve 1: same as for the symbols except that the linearized Poisson–Boltzmann equation is considered (eqn (39)). Curve 2: computation following Deryagin’s approach with non-linearized PB equation (eqn (14)–(16), (19)). Curve 3: issued following Deryagin’s approach with linearized PB equation (eqn (25)). (D–F) 2D potential contour plots (in V) in 100 mM (panel D), 10 mM (panel E) and 1 mM (panel F) electrolyte bulk concentration at two separation distances  $\kappa H$  (indicated). Results are issued from the numerical solution of 2D non-linear PB equation. Model parameters in (A–F):  $a_1 = a_2 = 10$  nm,  $N = 2$ ,  $M = 2$ , all  $\delta_k = 5$  nm,  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} = -3$ ,  $\beta_{j=2} = \rho_{j=2}/\rho_{j=1} = +3$ ,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM, all  $\alpha \rightarrow 0$ , all  $\mu \rightarrow 1$ ,  $z = 1$ . P1 and P2 stand for particles 1 and 2, respectively.

in Section 2.3.2 (eqn (29)–(32)) and that obtained following Deryagin formulation (eqn (19)) in combination with non-linearized PB equation. For that purpose, we consider the electrostatic interaction between two soft multi-layered particles with  $N = 2$ ,  $M = 2$  and ionogenic sites are fully dissociated and homogeneously distributed within each layer of particles 1 and 2 ( $\alpha_k \rightarrow 0$ ). In addition, charge densities within layers  $i = 2$  and  $j = 1, 2$  are chosen positive with  $\beta_{i=1} = \rho_{i=1}/\rho_{i=2} = -3$ ,  $\beta_{j=2} = \rho_{j=2}/\rho_{j=1} = +3$ ,  $n_{i=2} = n_{j=1} = 10$  mM,  $\delta_k = 5$  nm and  $a_1 = a_2 = 10$  nm. Results are provided in Fig. 9 for three ionic strengths 100 mM (panel A), 10 mM (panel B) and 1 mM (panel C), which correspond to  $\kappa a_{1,2} \approx 10, 3$  and 1, respectively. As expected from the results commented in Section 3.1, the impact of internal particle layers  $i = 1$  and  $j = 2$  on the particle/particle electrostatic interaction features increases upon decrease of ionic strength. As a result,  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$  is positive at large ionic strengths where repulsive interaction between layers  $i = 2$  and  $j = 1$  predominantly contributes to  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ , while  $\Delta G_{el}^{SP-SP} < 0$  at sufficiently low  $c^\infty$  where this is the attractive interaction between layers  $i = 1$  and  $j = 2$  that significantly determines  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ . These trends are qualitatively reproduced within both rigorous treatment and approximate Deryagin formulation of the problem within the framework of non-linearized Poisson–Boltzmann equation. Quantitatively, eqn (14)–(16), (19) provide a satisfactory estimate for  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$  at 100 mM where curvature effects on potential distribution and interaction are most

negligible, in line with  $\kappa a_{1,2} \gg 1$  and  $H/R_{1,2} \ll 1$ . Under such ionic strength condition, application of Deryagin approximation leads to a slight overestimation of the exact  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ , a feature already reported for the electrostatic interactions between hard particles.<sup>1</sup> At 10 mM, eqn (14)–(16), (19) still reproduce in an acceptable manner the exact  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ , which is surprising in view of the corresponding value of  $\kappa a_{1,2}$ . In addition, contrary to the situation at  $c^\infty = 100$  mM, eqn (14)–(16), (19) now underestimate the correct  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$  at 10 mM. These elements are explained by the fact that Deryagin approximation leads to an overestimation of the contribution of the internal layer of particle 1 to  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ . Since this contribution is necessarily more important at 10 mM than at 100 mM, eqn (14)–(16), (19) predict positive but lower  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$  as compared to values obtained from eqn (29)–(32). For  $c^\infty = 1$  mM where attraction between layers  $i = 1$  and  $j = 2$  significantly governs particles interaction, eqn (14)–(16), (19) overestimate the magnitude of the exact  $\Delta G_{el}^{SP-SP}$ , as expected from the limits underlying the validity of Deryagin formulation.

The above discussion underlines that one should be very cautious in using eqn (19) (in conjunction with non-linearized PB equation) for predicting the respective contributions of each layer in determining the Gibbs energy of interaction between multi-layered systems. This warning was also formulated in Section 3.1 (Fig. 5) when discussing the limits of Debye–Hückel approximation in reproducing the sign of

$\Delta G_{el}^{sp-sp}$  for the interaction between multi-layered particles obeying the requirements for application of eqn (19). For the sake of comparison, we further report in Fig. 9 the  $\Delta G_{el}^{sp-sp}$  issued from eqn (39) which includes curvature effects *albeit* within Debye–Hückel approximation. As expected, agreement with rigorous results from eqn (29)–(32) is excellent to poor upon decrease of ionic strength, *i.e.* when increasing the magnitude of the local potentials within and outside the interacting interphases.

The 2D potential distributions under conditions of Fig. 9A–C are reported in Fig. 9D–F for  $\kappa H = 11$  (particles 1 and 2 are isolated) and  $\kappa H = 0.1$  (double layers strongly overlap). At 100 mM, it is remarkable to note that despite the dissymmetry of the particles, the equipotential lines distributed around the particles and within depth  $\sim 1/\kappa$  are symmetrical with respect to the position half way the separation distance. This is so because the identical layers  $i = 2$  and  $j = 1$  govern the particles interaction at 100 mM salt concentration. This symmetry is lost upon increase of the contribution of most internal particle layers, *i.e.* when decreasing  $c^\infty$  and/or decreasing  $\kappa H$ . In particular, at  $c^\infty = 1$  mM where Debye–Hückel approximation is inappropriate, the potential profiles around/within the particles and across the double layer overlap region strongly depend on the polar angle  $\theta$ . This is in line with the comment given in Section 2.3.1 where we anticipated the requirement for considering the  $\theta$ -dependent part of the  $\nabla^2$  operator within the modeling of electrostatic interactions between moderately to highly charged multi-layered particles.

#### 4. Conclusions

The main purpose of this paper is to give a comprehensive elaboration of electrostatic interaction between spherical soft multi-layered (bio)particles, *e.g.* bacteria, viruses or multi-layered polyelectrolyte particles. A model is used which is sufficiently complete to tackle all situations in terms of particles size, magnitude of charge densities, dissociation of ionogenic groups or degree of interphasial diffuseness. In addition, it applies to all cases of homo- and hetero-interactions between hard, soft or entirely porous colloids. The model is elaborated from the general expression for the Gibbs electrostatic interaction energy between hard particles as originally derived by Verwey and Overbeek. The electrostatics is further formulated within the framework of non-linearized Poisson–Boltzmann equation which includes the effects of partial dissociation of ionogenic groups and their heterogeneous distribution within each layer composing the interacting multi-layered interphases. Special attention is devoted to particles like bacteria of which sizes justify application of Deryagin treatment within ionic strength range of practical interest (typically 1 mM–100 mM).

Our approach offers an improvement of a recent model by Ohshima<sup>47</sup> which was mainly developed within Debye–Hückel and Deryagin approximations for the electrostatic interaction between soft mono-shell particles. The results reported here strongly underline the limits of this analytical theory in adequately interpreting the role played by each layer around interacting multi-layered particles in governing both

magnitude and sign of their overall electrostatic interaction features.

#### Acknowledgements

This work was for a part financially supported by the French program ANR-07-JCJC-0024-01 PHYSCHEMBACT. J. F. L. Duval also thanks the Presidence de l’Institut National Polytechnique de Lorraine for funding the 6 months post doctoral stage of Dr Narayana at the Laboratory Environment and Mineral Processing.

#### Glossary of symbols

##### Subscripts

- Index  $i$  Refers to the  $i$ th-layer within multi-layered interphase 1 ( $i = 1, \dots, N$ ).
- Index  $j$  Refers to the  $j$ th-layer within multi-layered interphase 2 ( $j = 1, \dots, M$ ).
- Index  $k$   $k = i$  and  $k = j$  refer to the  $i$ -th and  $j$ -th layer within multi-layered interphases 1 and 2, respectively.

##### Main symbols

- $a_1$  Radius of the hard core of particle 1.
- $a_2$  Radius of the hard core of particle 2.
- $c^\infty$  Bulk concentration of  $z : z$  electrolyte.
- $f_k$  Function used for defining the spatial distribution of ionogenic groups within the  $k$ th-layer.
- $g^{(1)}$  Function used for defining the spatial distribution of ionogenic groups across multi-layered interphase 1.
- $g^{(2)}$  Function used for defining the spatial distribution of ionogenic groups across multi-layered interphase 2.
- $h^{(1)}$  Function used for defining the spatial distribution of ionogenic groups across multi-layered interphase 1 with including their partial dissociation features.
- $h^{(2)}$  Function used for defining the spatial distribution of ionogenic groups across multi-layered interphase 2 with including their partial dissociation features.
- $H$  Separation distance between particles 1 and 2.
- $K_k$  Acidity constant associated to eqn (1) or eqn (2) within the  $k$ th layer.
- $M$  Number of layers around the core of particle 2.
- $N$  Number of layers around the core of particle 1.
- $n$  Position-dependent concentration of ionogenic groups.
- $n_k$  Volume concentration of ionogenic groups within the  $k$ th-layer when fully dissociated.
- $R_1$  Curvature radius of particle 1.
- $R_2$  Curvature radius of particle 2.
- $(r_1, r_2, \theta)$  Coordinate system as specified in Fig. 1A.
- $x$  Spatial position as defined in Fig. 1A.  $x$  runs from  $x = x_0 = 0$  to  $x = x_{N+M+1}$ .

$x_s$	Position defined by $x_s = (x_{N+1} - x_N)/2$ (relevant for homo-interaction).
$y$	Local dimensionless electrostatic potential.
$y_m$	Local dimensionless potential at $x = x_s$ (relevant for homo-interaction).
<i>Greek symbols</i>	
$\alpha_k$	Decay length for the spatial distribution of ionogenic groups concentration within the $k$ th-layer.
$\beta_k$	Dimensionless charge density within $k$ th-layer.
$\delta_k$	Thickness of the $k$ th-shell layer.
$\Delta G_{el}^{SP-SP}$	Electrostatic interaction Gibbs energy between two spherical particles.
$\Delta G_{el}^{SP-P}$	Electrostatic interaction Gibbs energy between a spherical particle and a plane.
$\Delta G_{el}^{P-P}$	Electrostatic interaction Gibbs energy between two planes.
$\varepsilon_k$	Parameter indicating the type of dissociation reaction relevant for the ionogenic groups distributed within the $k$ th-layer.
$\varepsilon_o\varepsilon_r$	Dielectric permittivity of the medium.
$\kappa$	Reciprocal screening Debye layer thickness.
$\mu_k$	Partial dissociation function for the ionogenic groups located within the $k$ th-layer.
$\nu$	Parameter expressing the stage of discharging process (see text for details).
$\psi$	Local electrostatic potential.
$\rho_{fix}$	Local charge density stemming from fixed charges distributed within multi-layered interphases 1 and 2.
$\rho_k$	Maximum charge density reachable within the $k$ th-layer.
$\Pi$	Disjoining pressure.

## References

- J. Lyklema, *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Particulate colloids*, Academic Press, 2005, vol. IV, ch. 3, Pair Interactions.
- E. S. Reiner and C. J. Radke, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1993, **47**, 59–147.
- D. Chan, J. W. Perram, L. R. White and T. W. Healy, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1975, **71**, 1046–1057.
- J. Lyklema and J. F. L. Duval, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2005, **114**, 27–45.
- J. F. L. Duval, F. A. M. Leermakers and H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2004, **20**, 5052–5065.
- M. Elimelech, J. Gregory, X. Jia and R. A. Williams, in *Particle Deposition and Aggregation—Measurement, Modelling and Simulation*, Elsevier, 1995.
- C. M. Roth and A. M. Lenhoff, *Langmuir*, 1993, **9**, 962–972.
- C. A. Haynes and W. Norde, *Colloids Surf., B*, 1994, **2**, 517–566.
- C. A. Haynes, E. Sliwinsky and W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.*, 1994, **164**, 394–409.
- M. Bremer, J. F. L. Duval, W. Norde and J. Lyklema, *Colloids Surf., A*, 2004, **250**, 29–42.
- L. J. Michot, C. Baravian, I. Bihannic, S. Maddi, C. Moyne, J. F. L. Duval, P. Levitz and P. Davidson, *Langmuir*, 2009, **25**, 127–139.
- J.-P. Hsu and Y.-C. Kuo, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **183**, 194–198.
- D. Chan, T. W. Healy and L. R. White, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1976, **72**, 2844–2865.
- T. W. Healy, D. Chan and L. R. White, *Pure Appl. Chem.*, 1980, **52**, 1207–1219.
- I. M. Metcalfe and T. W. Healy, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1990, **90**, 335–344.
- T. W. Healy and L. R. White, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1978, **9**, 303–345.
- S. Usui, *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, **97**, 247–253.
- S. L. Carnie and D. Y. C. Chan, *J. Colloid Interface Sci.*, 1993, **161**, 260–264.
- R. Ettelaie and R. Buscall, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1995, **61**, 131–160.
- S. H. Behrens and M. Borkovec, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 2918–2928.
- P. M. Biesheuvel, *Langmuir*, 2001, **17**, 3553–3556.
- P. M. Biesheuvel, *Langmuir*, 2001, **17**, 3557–3562.
- M. Guerin and J. Seaman, *J. Colloid Interface Sci.*, 2002, **250**, 492–495.
- N. Dan, *Langmuir*, 2002, **18**, 3524–3527.
- J. Walz, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1998, **74**, 119–168.
- M. Elimelech and C. R. O'Melia, *Langmuir*, 1990, **6**, 1153–1163.
- M. C. Herman and K. D. Papadopoulos, *J. Colloid Interface Sci.*, 1990, **136**, 385–392.
- M. C. Herman and K. D. Papadopoulos, *J. Colloid Interface Sci.*, 1991, **142**, 331–342.
- L. Suresh and J. Walz, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **183**, 199–213.
- L. Suresh and J. Walz, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **196**, 177–190.
- J. Czarnecki, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1986, **24**, 283–319.
- N. Sun and J. Y. Walz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **234**, 90–105.
- F. Gaboriaud, M. L. Gee, R. Strugnell and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2008, **24**, 10988–10995.
- J. F. L. Duval and F. Gaboriaud, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 184–195.
- J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer and J. F. L. Duval, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 3293–3312.
- V. J. Shamrock, J. F. L. Duval, G. G. Lindsey and F. Gaboriaud, *FEMS Yeast Res.*, 2009, **9**, 391–399.
- J. F. L. Duval, K. J. Wilkinson, H. P. van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 6435–6445.
- E. Rotureau, F. Thomas and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2007, **23**, 8460–8473.
- H. Ohshima, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1995, **62**, 189–235.
- J. F. L. Duval and H. Ohshima, *Langmuir*, 2006, **22**, 3533–3546.
- J. F. L. Duval, *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterization, in Electrophoresis of soft colloids: basic principles and applications*, ed. K. J. Wilkinson and J. Lead, John Wiley and Sons, Chichester, vol. 10, ch. 7, 2007.
- J. F. L. Duval, R. Zimmermann, A. L. Cordeiro, N. Rein and C. Werner, *Langmuir*, 2009, **25**(18), 10691–10703.
- J. F. L. Duval and S. Qian, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**(46), 12791–12804.
- R. Bos, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999, **23**, 179–230.
- F. F. Gosselin, J. F. L. Duval, J. Simonet, C. Ginevra, F. Gaboriaud, S. Jarraud and L. Mathieu, *Colloids Surf., B*, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.08.040, in press.
- A. Clements, F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, J. L. Farn, A. W. Jenney, T. Lithgow, O. L. C. Wijburg, E. L. Hartland and R. A. Strugnell, *PLoS One*, 2008, **3**(11), e3817.
- H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **328**, 3–9.
- H. Ohshima and A. Hyono, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **333**, 202–208.
- B. V. Deryagin, *Kolloid-Z.*, 1934, **69**, 155–164.
- H. Ohshima and T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.*, 1993, **155**, 499–505.
- R. Koning, S. Van den Worm, J. R. Plaisier, J. Van Duin, J. P. Abrahams and H. Koerten, *J. Mol. Biol.*, 2003, **332**, 415–422.
- J. S. Barbosa, R. R. Costa, A. M. Testera, M. Alonso, J. C. Rodríguez-Cabello and J. F. Mano, *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, **4**, 1247–1253.
- L. Ionov and N. Houbenov, *Biointerphases*, 2009, **4**, FA45–FA49.
- H. M. Rijnaarts, W. Norde, J. Lyklema and A. J. B. Zehnder, *Colloids Surf., B*, 1999, **14**, 179–195.

- 
- 55 E. Donath and J. Voigt, *J. Colloid Interface Sci.*, 1986, **109**, 122–139.
- 56 S. S. Dukhin, R. Zimmermann and C. Werner, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, **274**, 309–318.
- 57 T. Shinagawa, H. Ohshima and T. Kondo, *Biophys. Chem.*, 1992, **43**, 149–156.
- 58 U. Ascher, J. Christiansen and R. D. Russel, *Assoc. Comput. Mach., Trans. Math. Software*, 1981, **7**, 209.
- 59 W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery, *Numerical Recipes in Fortran, The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, New York, 2nd edn, 1986.
- 60 R. Tokugawa, K. Makino, H. Ohshima and T. Kondo, *Biophys. Chem.*, 1991, **40**, 77–80.
- 61 E. J. Verwey and J. Th. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam, 1948.
- 62 H. Ohshima and T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **123**, 136–142.

## SUPPORTING INFORMATION

# Electrostatic Interactions Between Diffuse Soft Multi-Layered (Bio)Particles: Beyond Debye-Hückel Approximation and Deryagin Formulation

Jérôme F.L. Duval,<sup>\*</sup> Jenny Merlin, Puranam A. L. Narayana

Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, UMR7569 CNRS, BP 40 – F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

*1. Analytical expression for the electrostatic potential profile within Debye-Hückel and Deryagin approximations assuming homogeneous distribution and complete dissociation for ionogenic groups within each layer composing the interphases 1 and 2.*

Under conditions of low electrostatic potentials ( $y(x) \ll 1$ ), complete dissociation ( $\mu_k(y) \rightarrow 1$ ) and homogeneous distribution ( $\alpha_k \rightarrow 0$ ) of ionogenic groups within each layer composing the multi-layered interphases 1 and 2, the potential distribution profile reads as

$$y_1(x) = \tilde{\rho}_1 + \frac{\cosh(\kappa x)}{\sinh(\kappa x_{N+M+1})} \sum_{m=2}^{N+M+1} (\tilde{\rho}_{m-1} - \tilde{\rho}_m) \sinh[\kappa(x_{m-1} - x_{N+M+1})] \quad (S1)$$

$$y_{2 \leq m \leq N+M}(x) = \tilde{\rho}_m + \frac{1}{\sinh(\kappa x_{N+M+1})} \left\{ \cosh[\kappa(x - x_{N+M+1})] \sum_{u=2}^m (\tilde{\rho}_{u-1} - \tilde{\rho}_u) \sinh(\kappa x_{u-1}) + \cosh(\kappa x) \sum_{u=m+1}^{N+M+1} (\tilde{\rho}_{u-1} - \tilde{\rho}_u) \sinh[\kappa(x_{u-1} - x_{N+M+1})] \right\} \quad (S2)$$

$$y_{N+M+1}(x) = \tilde{\rho}_{N+M+1} + \frac{\cosh[\kappa(x - x_{N+M+1})]}{\sinh(\kappa x_{N+M+1})} \sum_{m=2}^{N+M+1} (\tilde{\rho}_{m-1} - \tilde{\rho}_m) \sinh[\kappa x_{m-1}] \quad (S3)$$

, where  $y_{1 \leq m \leq N+M+1}(x) = y(x_{m-1} \leq x \leq x_m)$ ,  $\tilde{\rho}_{1 \leq i \leq N} = \rho_{1 \leq i \leq N} / (2Fz c^\infty)$ ,  $\tilde{\rho}_{N+1} = 0$  and  $\tilde{\rho}_{N+2 \leq u \leq N+M+1} = \rho_{1 \leq j = u - N - 1 \leq M} / (2Fz c^\infty)$  with  $\rho_i$  and  $\rho_j$  defined in the main text.

*2. Semi-analytical formulation of  $\Pi(H)$ ,  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H)$  and  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$  within Debye-Hückel and Deryagin approximations under the conditions  $\alpha_k \rightarrow 0$  and  $\mu_k(y) \neq 1$ .*

For  $y(x) \ll 1$ ,  $\alpha_k \rightarrow 0$  and  $\mu_k(y) \neq 1$ , the linearized form of eq 14 in the space region  $x_{m-1} \leq x \leq x_m$  with  $m = 1, \dots, N + M + 1$  is provided by

$$x_{m-1} \leq x \leq x_m : \quad \frac{d^2 y_m(x)}{dx^2} - \kappa^2 \left[ 1 + \frac{\tilde{\rho}_m \gamma_m \tilde{\epsilon}_m}{z(1 + \gamma_m)^2} \right] y(x) = -\kappa^2 \frac{\tilde{\rho}_m}{(1 + \gamma_m)}, \quad (\text{S4})$$

In eq S4,  $y_{1 \leq m \leq N+M+1}(x)$  and  $\tilde{\rho}_m$  are defined below eq S3 and  $\tilde{\epsilon}_{1 \leq i \leq N} = \epsilon_{1 \leq i \leq N}$ ,  $\tilde{\epsilon}_{N+1} = 0$ ,

$$\tilde{\epsilon}_{N+2 \leq m \leq N+M+1} = \epsilon_{j=m-N-1}, \quad \gamma_{1 \leq m \leq M+N+1} = 10^{-\tilde{\epsilon}_m(\text{p}\tilde{K}_m - \text{pH})} \quad \text{with}$$

$\tilde{K}_{1 \leq i \leq N} = K_{1 \leq i \leq N}$ ,  $\text{p}\tilde{K}_{N+1} = 0$  and  $\tilde{K}_{N+2 \leq m \leq N+M+1} = K_{j=m-N-1}$ . It is here recalled that index  $i$  and  $j$  pertain to layer  $i$  and  $j$  within interphase 1 and 2, respectively (see main text and Glossary therein). The solutions of eq S4 then read as

$$x_{m-1} \leq x \leq x_m : \quad y_{1 \leq m \leq N+M+1}(x) = A_m \cosh(\lambda_m x) + B_m \sinh(\lambda_m x) + \omega_m \quad (\text{S5})$$

where  $A_m$  and  $B_m$  are constants to be determined and  $\lambda_m = \kappa \left[ 1 + \frac{\tilde{\rho}_m \gamma_m \tilde{\epsilon}_m}{z(1 + \gamma_m)^2} \right]^{1/2}$ ,

$$\omega_m = \left( \frac{\kappa}{\lambda_m} \right)^2 \frac{\tilde{\rho}_m}{(1 + \gamma_m)}. \quad \text{Applying adequately the boundaries given by eqs 15-16 together with}$$

the continuity equations for the potential and electric field at the positions  $x_{m=1, \dots, M+N+1}$ , we show that the  $A_m$  and  $B_m$  are solutions of the algebraic equations written in the matrix form

$$T \cdot \vec{S} = \vec{C}, \quad (\text{S6})$$

where  $\vec{S}$  and  $\vec{C}$  are the  $2(N + M + 1)$  column vectors defined by

$$\vec{S} = \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ A_{N+M+1} \\ B_1 \\ B_2 \\ \vdots \\ B_{N+M+1} \end{pmatrix}, \quad \vec{C} = \begin{pmatrix} \omega_2 - \omega_1 \\ \omega_3 - \omega_2 \\ \vdots \\ \omega_{N+M+1} - \omega_{N+M} \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{S7})$$

and  $T$  the  $2(N + M + 1) \times 2(N + M + 1)$  matrix of which the elements  $t_{i,j}$  are defined by the relationships

$$i = 1, \dots, N + M : \quad \begin{cases} t_{i,i} = \cosh(\lambda_i x_i) \\ t_{i,i+N+M+1} = \sinh(\lambda_i x_i) \\ t_{i,i+1} = -\cosh(\lambda_{i+1} x_i) \\ t_{i,i+N+M+2} = -\sinh(\lambda_{i+1} x_i) \end{cases} \quad (\text{S8-S11})$$

$$i = N + M + 1, \dots, 2N + 2M : \begin{cases} t_{i,i-M-N} = \lambda_{i-N-M} \sinh(\lambda_{i-N-M} x_{i-N-M}) \\ t_{i,i+1} = \lambda_{i-N-M} \cosh(\lambda_{i-N-M} x_{i-N-M}) \\ t_{i,i-N-M+1} = -\lambda_{i-N-M+1} \sinh(\lambda_{i-N-M+1} x_{i-N-M}) \\ t_{i,i+2} = -\lambda_{i-N-M+1} \cosh(\lambda_{i-N-M+1} x_{i-N-M}) \end{cases} \quad (\text{S12-S15})$$

$$t_{2N+2M+1, N+M+2} = 1 \quad (\text{S16})$$

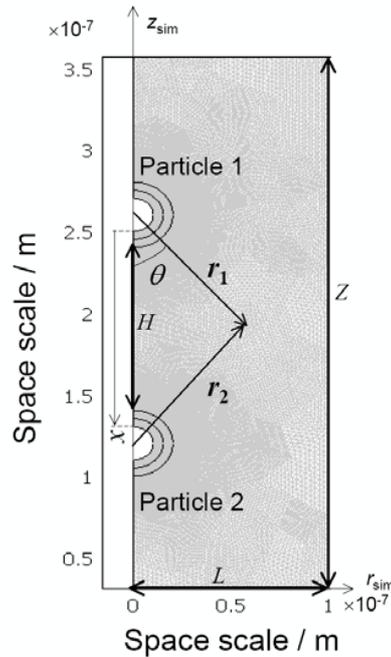
$$\begin{cases} t_{2N+2M+2, N+M+1} = \sinh(\lambda_{N+M+1} x_{N+M+1}) \\ t_{2N+2M+2, 2N+2M+2} = \cosh(\lambda_{N+M+1} x_{N+M+1}) \end{cases} \quad (\text{S17-S18})$$

and  $t_{i,j} = 0$  for couples  $(i, j)$  which are not specified in eqs S8-S18. For a given separation distance  $H = x_{N+1} - x_N$ , the sets of solution  $A_m$  and  $B_m$  may be obtained from eqs S6-S18 using Newton-Raphson method.<sup>1</sup> Combining eq S5 and eq 21, we further obtain for the disjoining pressure

$$\Pi(H) = \frac{\kappa^2 \varepsilon_0 \varepsilon_r}{2} \left( \frac{RT}{zF} \right)^2 \left\{ [A_{N+1}(H)]^2 - [B_{N+1}(H)]^2 \right\} \quad (\text{in N m}^{-2}) \quad (\text{S19})$$

where we explicitly indicated that  $A_{N+1}$  and  $B_{N+1}$  both depend on  $H$ . Once  $\Pi(H)$  determined, the integrations given by eqs 18-19 in the main text may be carried out using Simpson's rule,<sup>1</sup> which in turn yields  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{p-p}}(H)$  and  $\Delta G_{\text{el}}^{\text{sp-sp}}(H)$ .

### 3. Computation of 2D potential distribution between soft multi-layered particles using COMSOL Multiphysics environment.



**Figure S1.** Typical simulation box used within Comsol Multiphysics environment for the evaluation of the potential distribution between two soft multi-layered particles separated by distance  $H$ . The example is given for the situation considered in Figure 9 of the main text ( $N = 2, M = 2$ ). For the sake of convenience, calculations were performed in *axi-symmetric cylindrical geometry* with the coordinate system  $(r_{\text{sim}}, z_{\text{sim}})$  as indicated in the figure. Because of symmetry argument, the problem is indeed invariant upon rotation around the axis  $r_{\text{sim}}=0$ . It was systematically verified that the obtained numerical solutions for the potential profiles were independent of the size/local density of the chosen mesh (an example of which is given in the figure) and size of the simulation box as subsumed in the variables  $L$  and  $Z$ . In particular for positions far from the particles, bulk condition for the electrostatic potential was assigned (*i.e.*  $y \rightarrow 0$ ). The situation is therefore that of two spherical multi-layered particles enclosed in a large cylinder of height  $Z$  and radius  $L$ . Computation of the volume integral involved in eq 29 of the main text was of course performed using the appropriate integral definition in cylindrical geometry. Also, depending on the geometry adopted for the interacting systems (spherical or planar), eqs 33-36 or eqs 37-38 were expressed in terms of the coordinates  $(r_{\text{sim}}, z_{\text{sim}})$  using straightforward geometrical relations existing between  $r_1, r_2, r_{\text{sim}}, z_{\text{sim}}$  or  $r_1, x, r_{\text{sim}}, z_{\text{sim}}$  where  $r_1, r_2$  and  $x$  are defined in Figure 1 of the main text and are recalled in Figure S1.

#### References.

1. Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. in *Numerical recipes in Fortran, The Art of Scientific Computing*, 2<sup>nd</sup> ed.; Cambridge University Press: New-York, 1986.

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation à l'aide d'un formalisme théorique, des interactions électrostatiques entre (bio)particules sphériques molles multicouches, *e.g.* bactéries, virus, ou entre particules polyélectrolytes multicouches. Le modèle utilisé est suffisamment complet pour intégrer toutes les situations en terme de taille de particules, magnitude des densités de charge, dissociation des groupes ionogéniques ou degré d'hétérogénéité dans la distribution spatiale de ces groupements. De plus, tous les cas d'homo/hétéro-interactions, c'est-à-dire les interactions entre mêmes/différentes interfaces, entre colloïdes durs, mous ou entièrement poreux peuvent être traitées. Une attention particulière est dédiée aux particules comme les bactéries dont la taille justifie l'application du traitement de Derjaguin dans la gamme de forces ioniques d'intérêt (typiquement entre 1 et 100mM). Notre approche offre une amélioration du récent modèle d'Ohshima qui était principalement développé dans le cadre des approximations de Derjaguin et de Debye-Hückel pour les interactions électrostatiques entre particules molles faiblement chargées enveloppées d'une seule couche homogène perméable. Les résultats reportés ici soulignent fortement les limites de cette théorie analytique pour interpréter correctement la contribution de chaque couche perméable enveloppant les particules en interaction dans le contrôle de la magnitude et du signe de leur énergie d'interaction électrostatique.

De plus, d'autres propriétés physico-chimiques de (bio)particules molles peuvent aisément être intégrées dans ce modèle. Parmi elles citons par exemple l'hétérogénéité des groupements chimiques portés par la surface et/ou par les couches perméables de la particule et les mécanismes de régulation de leur charge.

Notons finalement que, en relation avec des expériences de microscopie à force atomique (AFM) réalisées dans le cadre de ce travail de thèse, ce formalisme peut être utilisé pour l'interprétation des interactions électrostatiques issues de l'approche d'une pointe de dimension nanométrique (pointe AFM) vers une bactérie de type *e.g. Escherichia Coli* (voir la publication et Supporting Information du chapitre 6).



## **Chapitre 3**

# **Analyse de la Spéciation Dynamique de Métaux dans des Films Minces : Couplage entre Processus Électrodynamiques et Chémodynamiques**

Merlin, J. ; Duval, J. F. L., Metal Speciation in Complexing Soft Film Layer : A Theoretical Dielectric Relaxation Study of Coupled Chemodynamic and Electrodynamic Interfacial Processes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (13), 4491-4504.



Dans les milieux naturels aquatiques, les ions métalliques sont présents sous une large gamme de complexes résultant de leur interaction avec des molécules ou des systèmes colloïdaux biotiques ou abiotiques comme les acides humiques, les microorganismes ou les films organiques. Ces divers complexes diffèrent largement en termes de taille, de géométrie et de nature, et, par conséquent, impactent différemment sur la réactivité, mobilité ou biodisponibilité des ions métalliques dans les milieux environnementaux et biologiques.

Les particules colloïdales complexantes sont définies par le confinement de leurs sites réactifs dans la géométrie de la particule, soit à la surface ou au sein d'une couche de polyélectrolytes perméable aux ions. Par conséquent, les processus de spéciation métallique dans des suspensions de particules molles complexantes sont contrôlés par le couplage entre les cinétiques de réactions locales et le transfert massique des ions métaux libres depuis/vers la particule. Des formalismes théoriques proposent l'étude de la formation de complexes métalliques entre particules colloïdales complexantes et cations métalliques en fonction de la taille, de la charge, de la perméabilité du colloïde et des conditions de flux hydrodynamiques [1-3]. Ces résultats ont conduit à une profonde relecture du schéma classique d'Eigen développé pour quantifier les cinétiques de formation de complexes entre métaux et ligands moléculaires. Cependant ces modèles sont seulement applicables dans les situations de régime stationnaire, c'est-à-dire dans la gamme temporelle où les flux des ions métalliques (contrôlés par les processus chimiques et de transport) depuis/vers la particule ne dépendent pas du temps. Les doubles couches électriques (DCE) aux interfaces particules/solution sont supposées à l'équilibre. Les champs électrostatiques autour et à l'intérieur de la particule maintiennent donc une configuration totalement relaxée durant l'intégralité du transport massique des métaux depuis/vers la particule et durant la complexation métallique.

Cette approximation n'est cependant pas systématiquement satisfaite (voir le chapitre 1 §1.4.4). En effet, dans certaines situations, la diffusion des ions métalliques depuis/vers les particules complexantes est reliée aux processus électrodynamiques aux interfaces molles, c'est-à-dire à la dynamique d'établissement de la DCE à l'intérieur et à l'extérieur de la particule. De plus, il est nécessaire d'intégrer les processus électrodynamiques pour l'étude de la chimodynamique de complexes métalliques colloïdaux lorsque le temps d'établissement de la DCE intra et extra-particulaire est supérieur ou du même ordre de grandeur que celui associé à la formation du complexe métallique. La DCE n'est pas totalement relaxée durant la formation du complexe pour de tels cas. Le couplage entre processus électrodynamiques et

chémodynamiques aux interphases molles intervient également dans le cas où les cations métalliques participent eux-mêmes à l'établissement de la DCE intra et extra-particulaire, c'est-à-dire lorsque la quantité d'ions indifférents dans la solution et/ou le nombre de sites réactifs dans/à la surface de la particule n'est pas en large excès par rapport à la quantité de métaux dans la solution.

Ces différents arguments ont motivé ce travail qui repose essentiellement sur l'examen du couplage entre processus chémodynamiques de complexes métalliques colloïdaux et processus électrodynamiques à l'interface de ces colloïdes. Nous considérons ici la situation où les sites réactifs, pouvant former des complexes avec des ions métalliques en solution, sont distribués à l'intérieur d'un film polyélectrolyte mou, perméable aux ions, immergé dans une solution électrolyte contenant les ions métalliques. Le film mou, initialement à l'équilibre, est perturbé par champ électrique alternatif. La relaxation de la DCE à l'interphase film mou/solution, gouvernée par les dynamiques de transport des ions et de cinétique de complexation, est examinée *via* la détermination de la polarisation de la DCE et de la permittivité diélectrique du film en fonction de la fréquence du champ appliqué. Cette fréquence peut être perçue comme une sonde temporelle qui permet de balayer notre examen des régions temporelles hors-équilibre pertinentes pour l'étude des processus chémodynamiques et électrodynamiques intervenant dans la spéciation de métaux à des interphases molles complexes.

Dans la publication présentée dans ce chapitre, la théorie est tout d'abord développée en insistant sur la nature des divers processus d'interface considérés et sur les expressions de leurs fréquences de relaxation associées, c'est-à-dire les fréquences de formation/dissociation du complexe et d'établissement de DCE. Les spectres diélectriques obtenus (variations de permittivité diélectrique en fonction de la fréquence du champ) sont examinés et discutés pour diverses combinaisons de ces trois fréquences caractéristiques. Finalement, des extensions futures de ce présent travail seront identifiées et discutées.

1. Duval, J. F. L.; Pinheiro, J. P.; Leeuwen, H. P. v., Metal Speciation Dynamics in Monodisperse Soft Colloidal Ligand Suspensions. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112* (31), 7137-7151.

2. Duval, J. F. L., Metal Speciation Dynamics in Soft Colloidal Ligand Suspensions. Electrostatic and Site Distribution Aspects. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (11), 2275-2293.

3. Duval, J. F. L.; Qian, S., Metal speciation dynamics in dispersions of soft colloidal ligand particles under steady-state laminar flow condition. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (46), 12791-12804.

# Metal speciation in a complexing soft film layer: a theoretical dielectric relaxation study of coupled chemodynamic and electrodynamic interfacial processes†

Jenny Merlin\* and Jérôme F. L. Duval

Received 16th November 2011, Accepted 6th February 2012

DOI: 10.1039/c2cp23611g

We report a comprehensive formalism for the dynamics of metal speciation across an interphase formed between a complexing soft film layer and an electrolyte solution containing indifferent ions and metal ions that form complexes with charged molecular ligands distributed throughout the film. The analysis integrates the intricate interplay between metal complexation kinetics and diffusive metal transfer from/toward the ligand film, together with the kinetics of metal electrostatic partitioning across the film/solution interphase. This partitioning is determined by the settling dynamics of the interfacial electric double layer (EDL), as governed by time-dependent conduction–diffusion transports of both indifferent and reactive metal ions. The coupling between such chemodynamic and electrodynamic processes is evaluated *via* derivation of the dielectric permittivity increment for the ligand film/electrolyte interphase that is perturbed upon application of an ac electric field (pulsation  $\omega$ ) between electrodes supporting the films. The dielectric response is obtained from the  $\omega$ -dependent distributions of all ions across the ligand film, as ruled by coupled Poisson–Nernst–Planck equations amended for a chemical source term involving the intra-film complex formation and dissociation pulsations ( $\omega_a$  and  $\omega_d$  respectively). Dielectric spectra are discussed for bare and film coated-electrodes over a wide range of field pulsations and Deborah numbers  $De = \omega_{a,d}/\omega_{diff}$ , where  $\omega_{diff}$  is the electric double layer relaxation pulsation. The frequency-dependent dynamic or inert character of the formed metal complexes is then addressed over a time window that ranges from transient to fully relaxed EDL. The shape and magnitude of the dielectric spectra are further shown to reflect the lability of dynamic complexes, *i.e.* whether the overall speciation process at a given pulsation  $\omega$  is primarily rate-limited either by complexation kinetics or by ion-transport dynamics. The limits, strengths and extensions of the approach are further discussed within the context of metal speciation dynamics at soft planar and particulate complexing interphases.

## 1. Introduction

In natural aquatic systems, metal ions are present over a large panel of complexes as a result of their interaction with molecular ligands, biotic or abiotic ligand colloidal systems such as humics, microorganisms or thin organic films.<sup>1</sup> These various complexes largely differ in size, geometry and nature and, therefore, differently impact the reactivity, mobility or bioavailability of metal ions in environmental and biological media.<sup>1,2</sup> Recent work demonstrated that the defining feature of ligand colloidal particles is the confinement of their binding

sites to the particulate body, either at the surface or within the so-called soft ion-penetrable polyelectrolyte layer.<sup>3–7</sup> Accordingly, the overall metal speciation process in dispersions of soft ligand particles is controlled by the coupling between local intra-particulate complexation kinetics and metal mass transfer from/toward the complexing particle. Theoretical formalisms are now available for defining the effective kinetic rate constant for the formation of complexes between colloids and metal ions as a function of size and charge of the colloid, hydrodynamic flow conditions and soft particle permeability.<sup>4,6,8–10</sup> These results have led to a profound review of the basic Eigen scheme<sup>11–13</sup> originally developed for quantifying the formation kinetics of complexes between metal ions and molecular ligands.

The models so far reported for the dynamics of colloidal metal complex formation essentially pertain to the steady-state situation (non-equilibrium chemical regime). The corresponding flux of metal ions from/toward the soft ligand

Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS UMR 7569, 15 avenue du Charmois, B.P. 40, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

E-mail: jenny.merlin@ensg.inpl-nancy.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2cp23611g

particles—as determined by mixed chemical kinetics and metal transport<sup>4–6,8–10</sup>—is time-independent. Within such a picture, the electric double layer (EDL for shortening) at the charged ligand particle/solution interphase is taken at equilibrium. The electric field distribution around and within the particle then supposedly maintains a completely relaxed configuration all during the metal mass transport from/toward the particle and during the very metal complexation step. The appropriateness of this approximation is however not systematically satisfied. Indeed, the characteristic time scale for the steady-state diffusion-limited metal complexation at a charged spherical nanoparticulate ligand of radius  $a$  is of the order of  $\tau_{\text{diff}} = a^2/D_M$ , where  $D_M$  is the diffusion coefficient of metal ions. The settling of particle electric double layer field takes place over a time scale  $\tau_{\text{EDL}} = 1/(\kappa^2 D)$ , where  $\kappa$  is the reciprocal Debye layer thickness and  $D$  is the diffusion coefficient of ions contributing to the EDL composition (for the sake of demonstration,  $D$  is taken identical for all these ions). In the case of nanoparticulate complexing systems, particle size and EDL thickness are comparable for a practical range of electrolyte concentrations (1 mM–100 mM). In turn, assuming  $D_M \approx D$ , we obtain  $\tau_{\text{EDL}} \approx \tau_{\text{diff}}$ . The latter equality basically implies that diffusion of metal ions from/toward ligand nanoparticles is necessarily interrelated with kinetics of their merely electrostatic partitioning outside and within the charged nanoparticulate body. The account of such interfacial electrodynamic processes within the modeling of chemodynamics of particulate metal complexes is also mandatory for a number of situations of practical interest where:

(i) The characteristic rate constant for the formation of a local metal–ligand pair within and/or at the surface of a complexing particle is of the same order of magnitude or faster than that required for building the EDL field around/within the nanoparticle. This situation is typically that where the background electrolyte does not establish double layers fast enough to stay ahead of *e.g.* the dehydration step in the Eigen mechanism.

(ii) Metal ions participate themselves in the settling of the EDL field. This case is that where there is no excess of background electrolyte and/or charged particulate ligand sites as compared to the amount of free metal ions in solution.

In view of the above arguments, it is timely to tackle the necessarily intricate coupling between chemodynamics of colloidal metal complexes and interfacial colloid electro-dynamics, which is essentially the purpose of this work. In this first attempt where the fundamentals of such a coupling are reported, we consider the practically relevant situation of a soft ion-penetrable ligand polyelectrolyte film immersed in an electrolyte solution containing indifferent ions and metal ions forming complex with reactive sites distributed throughout the film. The film/solution interphase, initially at equilibrium, is then subjected to an externally applied frequency-dependent electric field. The corresponding relaxation of the electric double layer, that is governed by the searched intertwined complexation kinetics and ion-transport dynamics, is examined *via* the determination of the frequency-dependent EDL polarization and film dielectric permittivity.

The article is organized as follows. The theory is first developed and emphasis is brought on the nature of the various

interfacial processes considered and the expression of their associated relaxation frequencies. The obtained dielectric spectra are then discussed for various sets of complex formation/dissociation Eigen frequencies in relation with the underlying chemodynamic features of the metal complex. Finally, future extensions of the current work are identified and discussed.

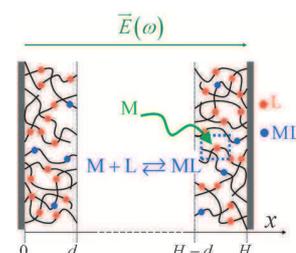
## 2. Theory

### 2.1. Description of the problem

In the following, we evaluate the dielectric response of soft, ion-permeable complexing films positioned in a cell whose geometry is typically that adopted for dielectric relaxation spectroscopy measurements.<sup>14,15</sup> In detail, two identical complexing films of thickness  $d$  are placed at the surface of parallel and ideally polarizable electrodes separated by a distance  $H$  (Fig. 1). The cell is filled with a solution containing an indifferent  $z : z$  symmetrical electrolyte of bulk concentration  $c^* = c^*_+ = c^*_-$  where the subscripts  $+$  and  $-$  stand for indifferent cations and anions, respectively. The medium further involves free metal species  $M^{z_M}$  of bulk concentration  $c_M^*$ , and counter-ions  $A^-$  of bulk concentration  $c_A^* = z_M c_M^*$  that ensure overall solution electroneutrality. Ligands of valence  $z_L$ , denoted as  $L^{z_L}$ , are distributed throughout the soft films and may react with metal ions  $M^{z_M}$  present in the medium according to the following complexation reaction



where  $k_a$  and  $k_d$  are the local complex formation and dissociation rate constants, respectively. The stability constant  $K$  of the complex  $ML^{z_M+z_L}$  is then defined by  $K = k_a/k_d$ . We further introduce the dimensionless quantity  $K' = Kc_L^*$ , where  $c_L^*$  is the bulk concentration of ligand sites  $L^{z_L}$  in the film when those are therein homogeneously distributed (see details below). In situations where the overall formation of metal complex  $ML^{z_M+z_L}$  follows the Eigen mechanism with a rate-limiting dehydration process,<sup>16</sup> the rate constant  $k_a$  is given by  $k_a = k_w K_{os}$ , where  $K_{os}$  pertains to the stability constant of the rapidly formed outer-sphere metal–ligand complex, and  $k_w$  is the rate constant of the rate-limiting dehydration step where a water molecule is released from the inner coordination sphere of the metal ion and a coordination bond between metal and ligand is formed. More general expressions for  $k_a$  are available for cases where the dehydration step is not rate-limiting.<sup>8</sup> For the sake of



**Fig. 1** Schematic representation of the soft ligand film layers submitted to an ac electric field applied between two electrodes supporting the films.

shortening, we further denote the ligands  $L^{\pm}$ , the free metal ions  $M^{\pm}$ , the metal counter-ions  $A^-$  and the formed complex species  $ML^{\pm M \pm \pm L}$  as L, M, A and ML, respectively. In line with practical arrangements of the dielectric cell,<sup>14,15</sup> the developments below exclude situations where there is overlap of electric double layers developing at the films/solution interphases, and cases where complexing films overlap. Consequently, the here-reported theory is applicable provided that  $\kappa H \gg 2$  and  $H \gg 2d$  are verified, where  $\kappa$  is the reciprocal Debye length defined by

$$\kappa = \left( \sum_{i=+, -, A, M} z_i^2 F^2 c_i^* / RT \varepsilon_0 \varepsilon_r \right)^{1/2} \quad \text{with } z = z_+ = z_-,$$

$z_A = -1$ ,  $F$  the Faraday number,  $R$  the gas constant,  $T$  the temperature and  $\varepsilon_0 \varepsilon_r$  the dielectric permittivity of the aqueous medium.

The formalism below integrates the possibility that ligands are heterogeneously distributed across the identical complexing films that face each other in the dielectric cell (Fig. 1). Adopting such concept of soft diffuse interphase as detailed elsewhere within the framework of electrohydrodynamics of soft particles and thin polyelectrolyte films,<sup>17–21</sup> the spatial profile for the total amount of ligands L potentially available for metal binding (*i.e.* prior to film exposure to metal ions) is given by

$$c_L^0(x) = \frac{c_L^*}{2} \chi \left\{ 2 - \tanh\left(\frac{x-d}{\alpha}\right) - \tanh\left(\frac{(H-x)-d}{\alpha}\right) \right\}, \quad (2)$$

where  $x$  is the dimension perpendicular to the films/solution interphases ( $0 \leq x \leq H$ , Fig. 1). The characteristic length  $\alpha$  reflects the gradual transition of ligand concentration from the bulk value deep inside the films to zero outside the films. In the limit  $\alpha \rightarrow 0$ , ligands are homogeneously distributed throughout the films and eqn (2) then reduces to  $c_L^0(0 \leq x \leq d, H-d \leq x \leq H) \rightarrow c_L^*$ , and  $c_L^0(d \leq x \leq H-d) \rightarrow 0$ . The parameter  $\chi$  involved in eqn (2) ensures that the total quantity of charged ligands within the films remains constant upon variation of  $\alpha$ , so that<sup>20</sup>

$$\chi = 2d \int_0^\infty \left\{ 1 - \tanh\left(\frac{x-d}{\alpha}\right) \right\} dx. \quad (3)$$

The reader is referred to ref. 18–23 for further details on the introduction of continuous polymer segment density within electrostatic modelling of soft interphases.

The electric double layers formed between the soft ligand film and the electrolyte solution are first let to reach equilibrium, *i.e.* complete relaxation. As detailed in the theoretical section, such equilibrium is met for a time scale that well exceeds  $(2\kappa D/H)^{-1}$ , where  $D$  pertains to the diffusion coefficient of ions in the medium. Following this equilibration step, electric double layer composition is perturbed upon application of a frequency-dependent electric field between the polarizable electrodes supporting the complexing films (Fig. 1). The magnitude of that field is written  $Ee^{j\omega t}$  where  $j$  is the imaginary number  $j^2 = -1$ ,  $t$  is the time and  $\omega$  is the field pulsation. The relaxation of the EDL is then followed as a function of the field frequency  $\omega$  via examination of the dielectric permittivity of the system. We provide in the next section the fundamental equations for the coupled ion-transport dynamics and complexation kinetics that govern the spatial and frequency-dependent distributions of all ionic species present in the electrolyte medium and/or across the

film layers. On the basis of these ion concentration profiles, expressions for the  $\omega$ -dependent polarization of the EDL and for the searched dielectric permittivity of the system are derived.

## 2.2. Governing equations for coupled chemodynamics and ion-transport dynamics

### 2.2.1. Electrostatic potential distribution at equilibrium (in the absence of applied field).

The first step of the analysis requires a description of the equilibrium situation, *i.e.* that met in the absence of the externally frequency-dependent applied electric field. At equilibrium, the concentration of background electrolyte ions and that of free metal species at a given position  $x$  across the cell,  $c_i^e(x)$  ( $i = +, -, M, A$ ) follow Boltzmann statistics

$$i = \pm, M, A : c_i^e(x) = c_i^* \exp(-z_i F \Psi^e(x) / RT), \quad (4)$$

where  $\Psi^e(x)$  is the local equilibrium electrostatic potential governed by the Poisson equation

$$\nabla^2 \Psi^e(x) = - \left\{ \sum_{i=\pm, M, A} z_i F c_i^e(x) + \sum_{k=L, ML} z_k F c_k^e(x) \right\} / \varepsilon_0 \varepsilon_r, \quad (5)$$

which is applicable when distances between film charges are well below the Debye layer thickness  $1/\kappa$  (smeared-out electrostatic condition).  $c_L^e(x)$  corresponds to the local equilibrium concentration of ligands that have not formed a pair-complex with M, and  $c_{ML}^e(x)$  that of ML complexes. Eqn (5) tacitly implies that the permittivity of the solution is taken identical to that inside the film, which is legitimate for sufficiently large water content within the film.<sup>19,22</sup> Relaxing this condition is straightforward *via* the account of the relevant spatial profile of dielectric permittivity within the Laplacian operator  $\nabla^2 = \partial^2/\partial x^2$  involved in eqn (5). The conservation of the amount of reactive sites L within the film imposes

$$c_L^0(x) = c_L^e(x) + c_{ML}^e(x). \quad (6)$$

Using the definition of the complex stability constant  $K$

$$K = c_{ML}^e(x) / [c_M^e(x) c_L^e(x)], \quad (7)$$

and combining eqn (7) with eqn (4)–(6), we show that the equilibrium electrostatic potential distribution is defined by the Poisson–Boltzmann equation

$$\begin{aligned} \tilde{\nabla}^2 y^e(\tilde{x}) &= \{ 2z c^* \sin h(z y^e(\tilde{x})) + z_M c_M^* e^{-z_M y^e(\tilde{x})} \\ &\times (e^{(1+z_M) y^e(\tilde{x})} - 1) - z_L c_L^0(\tilde{x}) [1 + (z_M/z_L) \\ &\times [1 + (K c_M^*)^{-1} \exp(z_M y^e(\tilde{x}))]]^{-1} \} / \sum_{i=\pm, M, A} z_i^2 c_i^*, \end{aligned} \quad (8)$$

where we have introduced the scaled axial position  $\tilde{x} = \kappa x$ , the scaled local equilibrium potential  $y^e(\tilde{x}) = F \Psi^e(\tilde{x}) / RT$  and the dimensionless Laplacian operator  $\tilde{\nabla}^2 = \kappa^{-2} \nabla^2$ . The boundary conditions associated to eqn (8) reflect that the ideally polarizable electrode surfaces are supposedly uncharged in the absence of applied electric field,<sup>17–19,23</sup> *i.e.*

$$\tilde{\nabla} y^e(\tilde{x})|_{\tilde{x}=0, \kappa H} = 0. \quad (9)$$

Modifications of eqn (9) for cases where electrodes carry a given surface potential or a given surface charge are detailed elsewhere.<sup>20</sup> Because the function  $c_L^0(x)$  introduced in eqn (2) is continuous and continuously differentiable in the spatial range  $0 \leq x \leq H$ , there is no need for introducing boundary conditions other than those specified by eqn (9) at the positions  $\tilde{x} = 0$  and  $\tilde{x} = \kappa H$ . The set of eqn (2)–(4), (6)–(9) defines the searched equilibrium distribution of the potential and that of the species  $p = +, -, A, M, ML$  for any position  $x$  across the cell. For the sake of simplicity and demonstration, the isotherm used in eqn (8) for describing the adsorption of metal ions to ligand films (at equilibrium) is expressed *via* a Langmuir equation corrected for local electrostatics. It should be noted that eqn (8) may be reformulated in terms of more sophisticated isotherms, as provided by *e.g.* the Non-Ideal Competitive Adsorption (NICA) model where heterogeneity, non-ideality and multicomponent competition may be included if necessary.<sup>24</sup> However, it is critical that these NICA isotherms include an electrostatic contribution that goes beyond the Donnan framework implemented in *e.g.* the NICA–Donnan model.<sup>25</sup> Indeed, the latter strictly holds for soft systems whose characteristic size well exceeds the Debye length, which is the necessary condition for assimilating the intra-substrate potential to Donnan potential.

**2.2.2. Frequency-dependent perturbations of local ion concentrations and electrostatic potential distributions across the cell (in the presence of applied field).** In line with situations of practical interest, the magnitude of the electric field applied between the electrodes supporting the films is sufficiently small for the response of the system to be treated according to linear perturbation theory. The resulting time-dependent potential and concentration profiles, denoted as  $\Psi(\tilde{x}, t)$  and  $c_{p=\pm, M, A, L, ML}(\tilde{x}, t)$  respectively, may then be formerly written as the sum of their equilibrium value (Section 2.2.1) and a first-order electric field perturbation term according to<sup>26</sup>

$$\beta(\tilde{x}, t) = \beta^e(\tilde{x}) + \delta\beta(\tilde{x})e^{j\omega t}, \quad (10)$$

where  $\beta(\tilde{x}, t)$  is a dummy function  $\beta(\tilde{x}) \equiv \Psi(\tilde{x}, t)$  or  $\beta(\tilde{x}) \equiv c_{p=\pm, M, A, L, ML}(\tilde{x}, t)$ . The flux of mobile ions  $J_{i=\pm, M, A}(\tilde{x}, t)$  at a given position  $\tilde{x}$  and time  $t$  is further given by

$$i = \pm, M, A : J_i(\tilde{x}, t) = -\frac{D_i}{RT} c_i(\tilde{x}, t) \nabla \mu_i(\tilde{x}, t), \quad (11)$$

which accounts for the conduction of mobile ions under the action of local potential gradient, and for their diffusion inside and outside the film. In eqn (11),  $D_i$  is the diffusion coefficient of ion  $i$  taken identical inside and outside the film, and the quantity  $\mu_i(\tilde{x}, t)$  stands for the electrochemical potential of ion  $i$  at position  $\tilde{x}$  and time  $t$

$$i = \pm, M, A : \mu_i(\tilde{x}, t) = \mu_i^\infty + z_i RT y(\tilde{x}, t) + RT \ln c_i(\tilde{x}, t), \quad (12)$$

which, following eqn (10), is rewritten in the form

$$i = \pm, M, A : \mu_i(\tilde{x}, t) = \mu_i^e + \delta\mu_i(\tilde{x})e^{j\omega t}, \quad (13)$$

where  $\mu_i^\infty$  is the electrochemical potential of ion  $i$  at some reference state,  $\mu_i^e$  that at equilibrium and  $\delta\mu_i(\tilde{x})$  is the first-order field perturbation of the electrochemical potential of

ion  $i$ . At equilibrium,  $\nabla \mu_i^e = 0$  so that the equilibrium quantities  $y^e(\tilde{x})$  and  $c_i^e(\tilde{x})$  are interrelated *via* the following equation<sup>27</sup>

$$i = \pm, M, A : \nabla y^e(\tilde{x}) = -\nabla c_i^e(\tilde{x})/[z_i c_i^e(\tilde{x})]. \quad (14)$$

Solving eqn (14) leads to the classical equilibrium Boltzmann law given by eqn (4). Combining eqn (10), (12) and (13) provides the following relationship between the key perturbation quantities involved in the problem

$$i = \pm, M, A : \delta\mu_i(\tilde{x}) = z_i RT \delta y(\tilde{x}) + RT \delta c_i(\tilde{x})/c_i^e(\tilde{x}). \quad (15)$$

In virtue of mass conservation conditions, applied to the indifferent free ion species present inside and outside the film, we further have

$$i = \pm, A : dc_i(\tilde{x}, t)/dt = -\nabla J_i(\tilde{x}, t). \quad (16)$$

For the sake of mathematical convenience, we now introduce the dimensionless first-order field perturbation term,  $\tilde{\Phi}_{i=\pm, M, A}(\tilde{x})$ , pertaining to the electrochemical potential of ion  $i = \pm, M, A$

$$i = \pm, M, A : \tilde{\Phi}_i(\tilde{x}) = -\delta\mu_i(\tilde{x})/(z_i RT). \quad (17)$$

Combining eqn (10)–(17) and discarding products of first-order field perturbation terms, we obtain the dimensionless Nernst–Planck equation written in terms of  $\tilde{\Phi}_{i=\pm, A}(\tilde{x})$ :

$$\begin{aligned} \tilde{\nabla}^2 \tilde{\Phi}_{\pm, A}(\tilde{x}) &= z_{\pm, A} \tilde{\nabla} y^e(\tilde{x}) \tilde{\nabla} \tilde{\Phi}_{\pm, A}(\tilde{x}) \\ &+ \frac{j\omega}{\kappa^2 D_{\pm, A}} (\tilde{\Phi}_{\pm, A}(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})). \end{aligned} \quad (18)$$

Unlike indifferent ions, free metal ions M may interact with sites L distributed in the films (eqn (1)). The mass conservation law for M at any position  $\tilde{x}$  and time  $t$  includes the diffusion/conduction mass transport modes of M from/toward the film/solution interphase corrected by a chemical source term

$$dc_M(\tilde{x}, t)/dt = -\nabla J_M(\tilde{x}, t) - k_a c_M(\tilde{x}, t) c_L(\tilde{x}, t) + k_d c_{ML}(\tilde{x}, t). \quad (19)$$

In the following, we introduce the relevant frequencies  $\omega_a = k_a c_L^*$  and  $\omega_d = k_d$  for the ML complex formation and dissociation, respectively. The combination of eqn (10)–(15), (17) and (19) applied to  $i = M$  then leads to

$$\begin{aligned} \tilde{\nabla}^2 \tilde{\Phi}_M(\tilde{x}) &= z_M \tilde{\nabla} y^e(\tilde{x}) \tilde{\nabla} \tilde{\Phi}_M(\tilde{x}) + \frac{j\omega}{\kappa^2 D_M} \\ &\left( 1 + \frac{\omega_a c_L^e(\tilde{x})/c_L^*}{j\omega + \omega_d(1 + K c_M^e(\tilde{x}))} \right) (\tilde{\Phi}_M(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})) \end{aligned} \quad (20)$$

Within the framework of this study, we do not consider the motion of the polymer chains within the films, or equivalently, we neglect the transport of L and ML that possibly results from (i) a local reformation of the polymer chains supporting L after a metal binding event,<sup>28</sup> or (ii) a local reorganization of the charged chains due to the applied electric fields.<sup>29</sup> The neglect of such chain dynamic processes is acceptable for stiff, fairly rigid

polymeric materials subjected to weak electrical stress. Under such conditions, the conservation equations for ML and L then simply reduce to

$$dc_{\text{ML}}(\tilde{x},t)/dt = -dc_{\text{L}}(\tilde{x},t)/dt = k_{\text{a}}c_{\text{M}}(\tilde{x},t)c_{\text{L}}(\tilde{x},t) - k_{\text{d}}c_{\text{ML}}(\tilde{x},t). \quad (21)$$

Combining eqn (21) with eqn (10) leads to

$$\delta c_{\text{ML}}(\tilde{x}) = -\delta c_{\text{L}}(\tilde{x}) = \frac{\omega_{\text{a}}c_{\text{L}}^{\text{e}}(\tilde{x})\delta c_{\text{M}}(\tilde{x})}{c_{\text{L}}^*(j\omega + \omega_{\text{d}}) + \omega_{\text{a}}c_{\text{M}}^{\text{e}}(\tilde{x})}. \quad (22)$$

The remaining required equation governs the time-variation of the potential distribution within and outside the soft ligand films. It is provided by the Poisson equation

$$\nabla^2\Psi(x,t) = -\left\{ \sum_{i=\pm,\text{M},\text{A}} z_i F c_i(x,t) + \sum_{k=\text{L},\text{ML}} z_k F c_k(x,t) \right\} / \varepsilon_0 \varepsilon_r, \quad (23)$$

which relates potential distribution and species concentration profiles in the presence of the applied electric field. Combination of eqn (23) with eqn (10) provides the relationship between first-order field perturbation terms

$$\nabla^2\delta y(\tilde{x}) = -\frac{F}{RT\varepsilon_0\varepsilon_r} \left\{ \sum_{p=i,k} z_p F \delta c_p(\tilde{x}) \right\}, \quad (24)$$

where the index  $p$  refers to the species  $i = \pm,\text{M},\text{A}$  and  $k = \text{L},\text{ML}$ . Finally, using eqn (15) and (22), we show after some developments that eqn (24) may be written in the form

$$\begin{aligned} \tilde{\nabla}^2\delta y(\tilde{x}) &= \frac{1}{\sum_{i=\pm,\text{M},\text{A}} z_i^2 c_i^{\text{e}}(\tilde{x})} \left[ z^2 c_+^{\text{e}}(\tilde{x}) [\tilde{\Phi}_+(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})] \right. \\ &+ z^2 c_-^{\text{e}}(\tilde{x}) [\tilde{\Phi}_-(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})] + c_{\text{A}}^{\text{e}}(\tilde{x}) [\tilde{\Phi}_{\text{A}}(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})] \\ &+ z_{\text{M}}^2 c_{\text{M}}^{\text{e}}(\tilde{x}) [\tilde{\Phi}_{\text{M}}(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})] \\ &\left. \times \left( 1 + \frac{\omega_{\text{a}}c_{\text{L}}^{\text{e}}(\tilde{x})/c_{\text{L}}^*}{j\omega + \omega_{\text{d}}(1 + Kc_{\text{M}}^{\text{e}}(\tilde{x}))} \right) \right]. \end{aligned} \quad (25)$$

The coupled differential equations (18), (20), (22) and (25) rule the searched spatial distribution of the frequency-dependent first-order field perturbation terms  $\delta y(\tilde{x})$ ,  $\tilde{\Phi}_{\pm,\text{A}}(\tilde{x})$ ,  $\tilde{\Phi}_{\text{M}}(\tilde{x})$ ,  $\delta c_{\text{ML}}(\tilde{x})$  and  $\delta c_{\text{L}}(\tilde{x})$ . The therein-involved equilibrium quantities  $y^{\text{e}}(\tilde{x})$  and  $c_{\text{p}}^{\text{e}}(\tilde{x})$  are defined by the set of equations detailed in Section 2.2.1. The boundary conditions associated to the perturbation terms pertaining to the potential and species concentrations are specified in the next section.

### 2.3. Setting the boundary conditions for the first-order field perturbation terms

Upon application of the electric field between the electrodes, the latter get slightly charged and acquire a surface charge density that we denote as  $\sigma_0$ . The potential  $\delta y(\tilde{x})$  then necessarily satisfies

$$\tilde{\nabla}\delta y(\tilde{x})|_{\tilde{x}=0,\kappa H} = -F\sigma_0/(RT\kappa\varepsilon_0\varepsilon_r). \quad (26)$$

The ideal polarizability of the electrodes further goes in pair with the absence of ionic or electronic charge transfer at the positions

$\tilde{x} = 0$  and  $\tilde{x} = \kappa H$  and further excludes the possibility of ion adsorption at the electrode surfaces, *i.e.*<sup>23</sup>

$$J_{i=\pm,\text{A},\text{M}}(\tilde{x} = 0) = J_{i=\pm,\text{A},\text{M}}(\tilde{x} = \kappa H) = 0, \quad (27)$$

or, equivalently,

$$\tilde{\nabla}\tilde{\Phi}_{i=\pm,\text{A},\text{M}}(\tilde{x})|_{\tilde{x}=0,\kappa H} = 0. \quad (28)$$

### 2.4. Evaluation of the dielectric response

The application of an external electric field through the cell depicted in Fig. 1 leads to conductive-diffusion fluxes of free (mobile) ion species. The dissymmetry in mobile charge distribution across the cell gives rise to a frequency-dependent electric polarization  $P(\omega)$ , which is a complex quantity defined by the first moment of the charge distribution

$$P(\omega) = \int_0^{\kappa H} \tilde{x} \sum_{i=\pm,\text{M},\text{A}} z_i F \delta c_i(\tilde{x}) d\tilde{x} / (\kappa^2 H) = P'(\omega) + jP''(\omega), \quad (29)$$

where  $P'(\omega)$  and  $P''(\omega)$  are the real and imaginary parts of  $P(\omega)$ , respectively. The first-order perturbation terms  $\delta c_i(\tilde{x})$  involved in eqn (29) are frequency-dependent. From eqn (15), we have  $\delta c_{i=\pm,\text{M},\text{A}}(\tilde{x}) = -[\tilde{\Phi}_i(\tilde{x}) + \delta y(\tilde{x})]z_i c_i^{\text{e}}(\tilde{x})$ , where the frequency-dependent terms  $\tilde{\Phi}_i(\tilde{x})$ ,  $\delta y(\tilde{x})$  and the equilibrium concentrations  $c_i^{\text{e}}(\tilde{x})$  are defined as detailed in Section 2.2.2 and Section 2.2.1, respectively. The two quantities of interest for the evaluation of the dielectric response of the soft ligand films are the frequency-dependent dielectric permittivity increment  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and dielectric loss  $\varepsilon''(\omega)$ , both scaled with respect to  $\varepsilon_0$ . The former corresponds to the part of the electric energy stored by the system while the latter represents the contribution dissipated in the form of thermal energy. The quantities  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and  $\varepsilon''(\omega)$  are defined by the set of equations

$$\Delta\varepsilon'(\omega) = \varepsilon'(\omega) - \varepsilon_r; \quad \varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega) \quad (30)$$

where  $\varepsilon(\omega)$  is the frequency-dependent complex permittivity whose real and imaginary parts are denoted as  $\varepsilon'(\omega)$  and  $\varepsilon''(\omega)$ , respectively.  $\varepsilon(\omega)$  is related to  $P(\omega)$  *via*<sup>30</sup>

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_r \sigma_0 / [\sigma_0 - P(\omega)]. \quad (31)$$

Using eqn (29)–(31), we finally obtain for  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and  $\varepsilon''(\omega)$  the expressions

$$\Delta\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_r \left( \frac{\sigma_0[\sigma_0 - P'(\omega)]}{[\sigma_0 - P'(\omega)]^2 + [P''(\omega)]^2} - 1 \right), \quad (32)$$

$$\varepsilon''(\omega) = -\varepsilon_r \frac{\sigma_0 P''(\omega)}{[\sigma_0 - P'(\omega)]^2 + [P''(\omega)]^2}. \quad (33)$$

Using eqn (26), it may be shown that  $P(\omega)$  is linearly related to the electrode surface charge so that, in turn,  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and  $\varepsilon''(\omega)$  remain independent of  $\sigma_0$ . In addition, it is verified that  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and  $\varepsilon''(\omega)$  are conjugate functions satisfying the Kramers–Kronig relations.<sup>31</sup>

### 2.5. Numerical solution

The complexity of the set of intertwined non-linear differential equations (8), (9), (18), (20), (25), (26) and (28) requires

resorting to numerical analysis in order to obtain the searched frequency-dependent functions  $\delta y(\tilde{x})$ ,  $\tilde{\Phi}_{\pm}(\tilde{x})$ ,  $\tilde{\Phi}_M(\tilde{x})$ ,  $\delta c_{ML}(\tilde{x})$  and the equilibrium quantities  $y^e(\tilde{x})$  and  $c_{\text{p}=\pm, \text{A}, \text{M}, \text{L}, \text{ML}}^e(\tilde{x})$ . For that purpose, we built a FORTRAN program and solved over a wide range of field pulsations of practical interest (Hz to MHz) the above set of differential equations by a collocation procedure making use of the COLSYS package.<sup>32</sup> Following such a strategy, the searched solutions are assimilated to polynomial functions estimated on an auto-adaptive spatial grid with a prescribed accuracy set to  $10^{-4}$ . The electric polarization (eqn (29)), the dielectric increment  $\Delta\epsilon'(\omega)$  and the dielectric loss  $\epsilon''(\omega)$  (eqn (32) and (33)) were then evaluated on the basis of the so-obtained  $\tilde{\Phi}_{i=\pm, \text{M}, \text{A}}(\tilde{x})$ ,  $\delta y(\tilde{x})$  and  $c_{i=\pm, \text{M}, \text{A}}^e(\tilde{x})$ . Within the sets of approximations detailed in the preceding developments, the formalism is applicable without any restriction on the film thickness and concentration  $c_L^*$  of ligands. It therefore covers the conventional Donnan limit strictly valid for  $\kappa d \gg 1$  and the Debye–Hückel limit applicable for  $y^e(\tilde{x}) < 1$ . In addition, straightforward extensions of the above set of equations may be done for cases where the electrolyte composition is more involved than that adopted in the current study.

The validity and robustness of the numerical scheme were successfully tested by comparing results with those obtained from (i) analytical expressions that we derive below in the low frequency-limit  $\omega \rightarrow 0$  (see Section 2.7) and (ii) analytical expressions already available in the literature,<sup>23,33,34</sup> albeit for the restrictive cases where electrodes are not covered by charged soft films and ions present in the electrolyte solution are all indifferent (see Section 2.6). We verified that the set of differential equations for the situation where soft charged films cover the electrodes (Sections 2.2., 2.3 and 2.4) is too complex for deriving analytical expressions of  $\Delta\epsilon'(\omega)$ , even in the Debye–Hückel limit.

## 2.6. Analytical expression of the electric polarization in the absence of soft ligand films for indifferent electrolytes

Let us consider the situation where electrodes are not covered by charged soft films and the electrolyte solution is monovalent ( $z = 1$ ) and indifferent, *i.e.* there is no chemical reaction involving ions and electrode surface. Further assuming  $D_+ = D_- = D_{\pm}$ , the differential equations (18) and (25) and associated boundaries (26) and (28) may then be simplified using the pertaining limits  $c_L^* = c_M^* = 0$ ,  $d = 0$  and  $K \rightarrow 0$ . After lengthy algebraic manipulations, we then obtain for  $\epsilon(\omega)$

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_r \left[ (1 + j\omega/\omega_{\text{EDL}})^{-1} \left\{ \left( \frac{\omega_{\text{H}}}{j\omega + \omega_{\text{EDL}}} \right)^{1/2} \times \frac{\cos h(2[(j\omega + \omega_{\text{EDL}})/\omega_{\text{H}}]^{1/2}) - 1}{\sin h(2[(j\omega + \omega_{\text{EDL}})/\omega_{\text{H}}]^{1/2})} - 1 \right\} + 1 \right]^{-1} \quad (34)$$

where  $\omega_{\text{EDL}} = \kappa^2 D_{\pm}$  is the characteristic frequency for building-up the EDL at the bare electrode surface. It physically corresponds to the time needed for ions to diffuse across a distance  $1/\kappa$ . The frequency  $\omega_{\text{H}} = 4D_{\pm}/H^2$  involved in eqn (34) corresponds to the reciprocal of the time required for ions to cross the cell by diffusion transport. Because local charge excesses created by ion diffusion are opposed by ion migration

fluxes and *vice versa*,  $\omega_{\text{EDL}}$  is comparable to  $\omega_{\text{cond}}$ , the relaxation frequency associated to ion migration within the EDL.<sup>35</sup> Eqn (34) is valid without restriction on the magnitude of  $\omega/\omega_{\text{EDL}}$  and it satisfactorily reduces to the expression obtained by Cirkel *et al.*<sup>34</sup> and Chassagne *et al.*<sup>23</sup> in the limit of practical interest  $\omega \ll \omega_{\text{EDL}}$ . In this limit, writing  $\epsilon_0 = \epsilon(\omega \rightarrow 0)$  and  $\epsilon_{\infty} = \epsilon(\omega \rightarrow \infty)$ , we show that eqn (34) can be written in the form of a Debye dispersion<sup>36</sup>

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_0 - \epsilon_{\infty}}{1 + j\omega/\omega_{\text{diff}}}, \quad (35)$$

where the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$ , the quantities  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0) = \epsilon'(\omega \rightarrow 0) - \epsilon_r$  and  $\epsilon_{\infty}$  are defined by

$$\begin{cases} \omega_{\text{diff}} = (\omega_{\text{H}}\omega_{\text{EDL}})^{1/2} = 2\kappa D_{\pm}/H, \\ \Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0) = \epsilon_r(\kappa H/2 - 1), \\ \epsilon_{\infty} = \epsilon_r. \end{cases} \quad (36)$$

These results are in full agreement with those derived from the equivalent resistance-capacitance (RC) series electrical circuit proposed by Buck<sup>33</sup> in his seminal analysis of the time-dependence of electrode polarization after application of a pulsed electric field between two bare electrode surfaces separated by an indifferent electrolyte solution. The single characteristic frequency  $\omega_{\text{diff}}$ , that is associated to the equivalent RC series circuit<sup>33,34</sup> of the system, may be expressed in the form  $\omega_{\text{diff}} = (R_{\text{sol}}C_{\text{EDL}})^{-1}$ , where  $C_{\text{EDL}}$  represents the charging capacitance of the EDL,  $C_{\text{EDL}} = \epsilon_0\epsilon_r\kappa S/2$  ( $S$  is the electrode surface area), and  $R_{\text{sol}} = H/(D\kappa^2\epsilon_0\epsilon_r S)$  corresponds to the electrolyte resistance expressed in terms of  $\kappa$ . We systematically verified that predictions from eqn (34)–(36) are in agreement with numerical results obtained in the limits  $c_L^* = c_M^* = 0$ ,  $d = 0$  and  $K \rightarrow 0$ .

## 2.7. Analytical expression of the electric polarization in the presence of soft ligand films

On the basis of the numerical scheme detailed in Section 2.5, we evaluated the dielectric spectra for the situation where electrodes are coated by charged homogeneous films ( $\alpha \rightarrow 0$ ) and are separated by a  $z : z$  indifferent electrolyte in the absence of reactive metal ions (limits  $c_M^* = 0$ ,  $c_A^* = 0$  and  $K \rightarrow 0$ ). The analysis reveals that the spectra do not conform to eqn (35) and do not follow Cole–Cole<sup>37,38</sup> or Havriliak–Negami<sup>39</sup> EDL relaxation expressions. Obviously, the presence of charged films at the electrode surfaces dramatically affects the potential distribution across the cell and, accordingly, invalidates the use of simple dispersion schemes. A careful inspection of the aforementioned spectra in the low and high frequency regimes further underlines that  $\epsilon(\omega \rightarrow \infty)$  systematically reduces to  $\epsilon_r$ , which is intuitively expected, and that  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  satisfies, in the limit of sufficiently thick film ( $\kappa d \gg 1$ ), the following relationship

$$\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0) = \epsilon_r(\kappa_m H/2 - 1), \quad (37)$$

where  $\kappa_m = \kappa[\cosh(zy^{\text{D}})]^{1/2}$  is the reciprocal Debye layer thickness in the film and  $y^{\text{D}} = \sinh^{-1}[z_L c_L^*/(2zc^*)]$  is the dimensionless equilibrium Donnan potential reached deep inside the films.<sup>18,27</sup> Eqn (37) constitutes the pendant of the expression for  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  given in eqn (36) in the case where electrode surfaces are not covered by film layers.

Eqn (37) basically corrects the Debye layer thickness,  $1/\kappa$ , by the Donnan potential drop across the film. Such correction was first reported by Ohshima,<sup>27,40</sup> who showed that the potential drop within a thick, charged and homogeneous film layer could be fully expressed in terms of an exponential decay function involving the quantities  $\kappa_m$  and  $y^D$ . While eqn (37) was found to reproduce the low frequency value of the dielectric permittivity for film-coated electrodes, we observed that the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$  for this system still satisfies  $\omega_{\text{diff}} \propto 1/H$ , in line with eqn (36), but that  $\omega_{\text{diff}}$  cannot be recovered with simply substituting  $\kappa$  by  $\kappa_m$  in eqn (36). It is likely that the electrostatic component of  $\omega_{\text{diff}}$  for film-coated electrodes is more involved than that expressed by eqn (36). Finally, we emphasize that  $\Delta\epsilon'(\omega)$  spectra numerically evaluated for various electrode separation distances  $H$  all reduce to the same curve when plotted in the form  $\Delta\epsilon'(\omega)/\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  as a function of  $\omega/\omega_{\text{diff}}$ .

For cases where the Donnan potential  $y^D$  is not reached in the bulk film layer, *i.e.* when  $\kappa d \approx 1$  or  $\kappa d < 1$ , we verified that eqn (37) still remains valid with  $\kappa_m$  now defined by  $\kappa_m = \kappa[\cosh(zy_o)]^{1/2}$ , with  $y_o = y^e(x=0)$  the equilibrium electrode surface potential of which semi-analytical expressions may be derived following the methodology reported by Ohshima.<sup>40,41</sup>

Finally, for cases where the electrolyte solution contains a  $z:z$  indifferent background electrolyte with reactive metal ions M and associated counter-ions A, the low-frequency value of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  may still be expressed by eqn (37) with  $\kappa_m$  now defined by

$$\kappa_m = [\kappa_{\pm}^2 \cosh(zy^D) + \kappa_A^2 \exp(y^D) + \kappa_M^2 \exp(-z_M y^D)]^{1/2}, \quad (38)$$

or

$$\kappa_m = [\kappa_{\pm}^2 \cosh(zy_o) + \kappa_A^2 \exp(y_o) + \kappa_M^2 \exp(-z_M y_o)]^{1/2}, \quad (39)$$

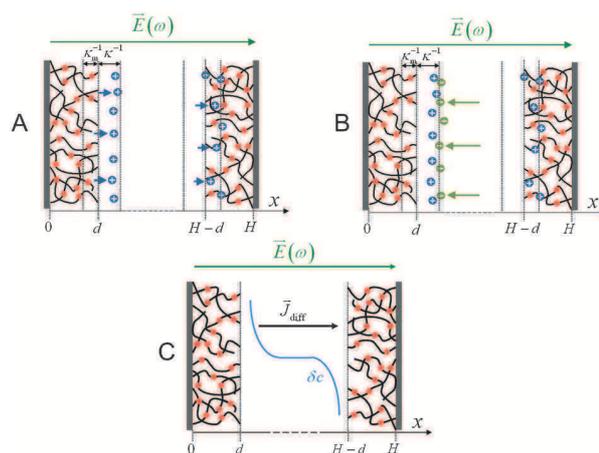
which hold for  $\kappa d \gg 1$  (Donnan condition) and  $\kappa d \approx 1$  or  $\kappa d < 1$ , respectively. The quantities  $1/\kappa_{\pm}$ ,  $1/\kappa_M$  and  $1/\kappa_A$  are the contributions of the indifferent ions, metal ions and counter-ions to the Debye layer thickness in solution, *i.e.*  $\kappa_{\pm}^2 = 2z^2 F^2 c^*/RT\epsilon_o\epsilon_r$ ,  $\kappa_M^2 = z_M^2 F^2 c_M/RT\epsilon_o\epsilon_r$  and  $\kappa_A^2 = z_A F^2 c_A/RT\epsilon_o\epsilon_r$ , respectively.

### 3. Results and discussions

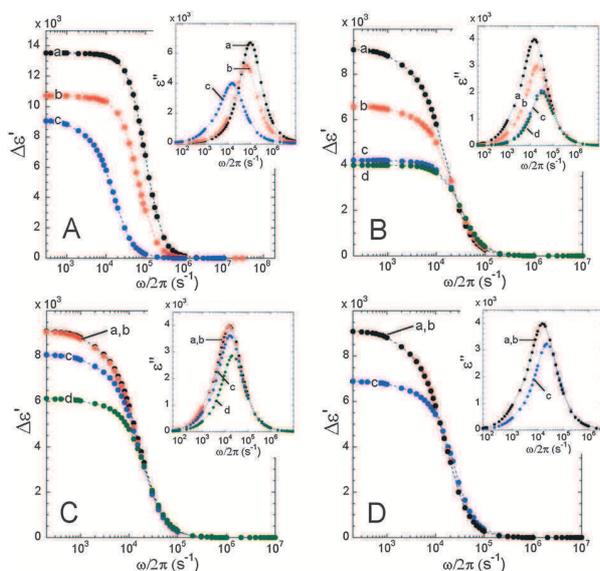
Understanding the impact of metal complexation dynamics on the dielectric response of soft ligand films first requires a detailed analysis of the frequency-dependent permittivities  $\Delta\epsilon'(\omega)$  and  $\epsilon''(\omega)$  in the situation where the electrolyte solution is indifferent, *i.e.* there are no metal ions able to form complexes with charged sites L distributed across the film. Accordingly, we discuss in a first stage (Section 3.1) the frequency-dependent dielectric response of a soft film as a function of  $z:z$  indifferent bulk electrolyte concentration  $c^*$ , film charge density  $z_L c_L^*$ , film thickness  $d$ , and film interphasial heterogeneity  $\alpha/d$ . In a second stage (Section 3.2), the coupling between electric double layer dynamics and dynamic inter-conversion of M into ML and *vice versa* within the film will be detailed for a number of illustrative cases that cover a broad range of electrodynamic relaxation frequency ( $\omega_{\text{diff}}$ ) and chemo-dynamic relaxation rates ( $\omega_a$  and  $\omega_d$ ).

#### 3.1. Interfacial polarization processes at the charged film/indifferent electrolyte interface

We demonstrated in Section 2.6 (eqn (36)) that the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$  for the bare electrode/indifferent electrolyte interfaces disposed in the dielectric cell is determined by intertwined diffusion of background ions across the electrode double layers (scaling distance  $1/\kappa$ , characteristic frequency  $\omega_{\text{EDL}}$ ) and across the entire cell (scaling distance  $H$ , characteristic frequency  $\omega_H$ ). The electric polarization at the charged film/indifferent electrolyte interface also depends on these transport mechanisms and a direct analogy may be drawn with polarization processes that take place at charged particles/solution interfaces.<sup>42</sup> Let us develop here this analogy. For that purpose, we consider negatively charged film layers immersed in a solution containing a symmetrical and indifferent  $z:z$  electrolyte (Fig. 1). After application of the electric field pointing from left to right (Fig. 2), counterions (cations in our case) composing the EDL start to migrate from left to right within the EDL regions. An accumulation (depletion) of cations is thus created on the right (left, respectively) side of the EDL, as illustrated in Fig. 2A. This mechanism occurs when the frequency of the electric field is lower than  $\omega_{\text{EDL}}$  and leads to an increased electric permittivity  $\epsilon'(\omega)$  with lowering  $\omega/\omega_{\text{EDL}}$ . This relaxation process can be assimilated to the so-called Maxwell–Wagner relaxation for charged colloidal particles.<sup>42</sup> For frequencies above  $\omega_{\text{EDL}}$ , there is no time for the cations to diffuse/migrate across the EDL regions so that the polarization associated to this transport mechanism drops to zero. At sufficiently low frequencies  $\omega \ll \omega_{\text{EDL}}$ , the free anions (cations) in the bulk solution diffuse from the right (left) to the left (right, respectively) side of the cell. Consequently, anions coming from bulk solution meet the excess of cations gathered outside the EDL at the left side of the cell (Fig. 2B). An accumulation of neutral electrolyte is therefore created on the left side of the cell, while opposite processes take place on the other side leading to a depletion of neutral electrolyte.



**Fig. 2** Schematic representation of the mobile ions displacement across the cell and the EDL region in the presence of a low-frequency ac field (A) and a high-frequency ac field (B). (C) Illustration of the concentration polarization phenomenon and scheme of the diffusion flux of neutral electrolyte (see the text for further details). For the sake of simplification, only counterions are represented in panel A and only cations are schemed in the bulk solution of panel B.



**Fig. 3** Variations of dielectric increment  $\Delta\epsilon'$  and dielectric loss  $\epsilon''$  (insets) as a function of field frequency  $\omega/2\pi$  (A) for the following indifferent electrolyte concentration: (a)  $c^* = 10$  mM; (b)  $c^* = 5$  mM and (c)  $c^* = 1$  mM; (B) for the following ligand concentrations: (a)  $c_L^* = 5$  mM; (c)  $c_L^* = 1$  mM and (d)  $c_L^* = 0.1$  mM. (C) for the following film thickness: (a)  $d = 50$  nm; (b)  $d = 25$  nm; (c)  $d = 10$  nm and (d)  $d = 5$  nm; (D) for the following degree of interphasial diffuseness: (a)  $\alpha/d \rightarrow 0$ ; (b)  $\alpha/d = 0.2$  and (c)  $\alpha/d = 2$ . Other parameters if not specified above:  $c^* = 1$  mM,  $c_L^* = 10$  mM,  $\delta = 50$  nm,  $\alpha/d \rightarrow 0$ ,  $H = 1$   $\mu\text{m}$ ,  $z = 1$ ,  $D_{\pm} = 10^{-9}$   $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ .

This phenomenon, known as concentration polarization, occurs at frequencies  $\omega \approx \omega_H$ . Finally, for frequencies below  $\omega_H$ , the resulting gradient of neutral electrolyte concentration induces diffusive fluxes from the left to the right side of the cell, which is accompanied by an increase in dielectric permittivity as further detailed in Section 3.2. The analogy with the so-called  $\alpha$ -relaxation of charged particles is straightforward. While the latter is attributed to diffusion of neutral electrolyte from one side of the particle to the other,<sup>42</sup> the low-frequency relaxation in our study stems from the diffusion of neutral electrolyte across the cell.

Two processes, with characteristic frequencies  $\omega_{\text{EDL}}$  and  $\omega_H$ , are involved in the polarization at a charged film/indifferent electrolyte. However, a single relaxation frequency, denoted as  $\omega_{\text{diff}}$ , is associated to the overall relaxation of the system in the dielectric cell. This feature is observed in the dielectric spectra displayed in Fig. 3, obtained for a charged film immersed in a solution involving indifferent ions only (Fig. 3 is largely discussed in the next sections). The dependence of the dielectric loss  $\epsilon''(\omega)$  on frequency (insets) exhibits a single maximum reached at the characteristic relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$ .

The magnitude of the low-frequency permittivity depends on that of the concentration polarization. Obviously, the concentration polarization is directly related to the quantity of counter-ions within the film and in the EDL. Increasing the amount of counter-ions following an increase in either electrolyte concentration or film charge density will increase both the amplitude of the concentration polarization and the magnitude of the dielectric permittivity. These trends are illustrated and discussed in more detail in the coming section

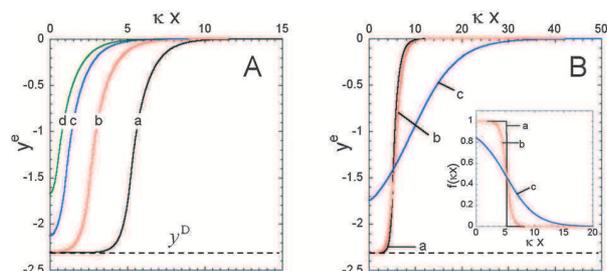
that deals with the effect of several film properties and indifferent electrolyte concentration on dielectric response.

### 3.1.1. Effect of the indifferent electrolyte concentration $c^*$

The typical dependence of the dielectric increment  $\Delta\epsilon'(\omega)$  for charged homogeneous films on frequency  $\omega/2\pi$  is displayed in Fig. 3A for various values of bulk indifferent electrolyte concentrations  $c^*$ . The inset represents the corresponding variations of the dielectric loss  $\epsilon''(\omega)$ . While  $\Delta\epsilon'(\omega)$  increases with decreasing frequency under all conditions examined, in line with arguments of Section 3.1, results show that for a fixed frequency,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  increases with increasing  $c^*$ . This increase is due to the contribution of added electrolyte that amplifies the magnitude of the concentration polarization and thereby that of the dielectric permittivity increment (see Section 3.1). It should be noted that the increase of  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  (eqn (37), Section 2.7) with increasing  $c^*$  is connected to the corresponding increase of  $\kappa_m$  that follows significant screening of film charges by ions present in the medium. Under the conditions of Fig. 3A where the Donnan condition applies ( $\kappa d > 1$ ), the increase of  $\kappa_m = \kappa[\cosh(z y^D)]^{1/2}$  or, equivalently, that of  $\kappa$  with  $c^*$  is sufficient to counterbalance the concomitant decrease in Donnan potential  $y^D = \sinh^{-1}[z_L c_L^*/(2zc^*)]$ , which, if solely considered, would lead to a reduction in  $\kappa_m$  and thus to a reduction in  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  with increasing  $c^*$ . Finally, Fig. 2A reveals a shift of the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$  toward higher values with increasing  $c^*$ . This shift is materialized by that of the maximum in the dielectric loss spectrum and is due to the compression of the EDL region as reflected by the increase in  $\kappa_m$  or  $\kappa$ . The distance the counter-ions have to travel across the EDL region after application of the field (Fig. 2A) is then reduced with increasing  $c^*$  so that the corresponding relaxation frequency increases. This feature is qualitatively in line with the  $\kappa$ -dependence of  $\omega_{\text{diff}}$  as expressed by eqn (36).

### 3.1.2. Effect of the film charge density $z_L c_L^*$

Fig. 3B represents the variations of  $\Delta\epsilon'$  and  $\epsilon''$  (inset) as a function of  $\omega$  for different ligand concentrations  $c_L^*$  ( $z_L$  is set to  $-1$  in Fig. 3) under the condition  $\kappa d \gg 1$ . At fixed frequency,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  is reduced upon decrease of the density of charges carried by the films. This is the direct consequence of the decrease in magnitude of the Donnan potential drop  $y^D$  across the film layers. Such decrease in  $|y^D|$  indeed leads to a decrease in the amount of counterions localized within the EDL regions and thus to a decrease in the magnitude of the concentration polarization and dielectric permittivity. The results are quantitatively in agreement with eqn (37) and with the  $c_L^*$ -dependence of the Donnan potential. In the limiting situation where the film is poorly charged or uncharged, *i.e.*  $z_L c_L^* \ll (2zc^*)$ , we have  $y^D \rightarrow 0$ , which explains why  $\Delta\epsilon'(\omega)$  becomes independent of  $c_L^*$  for sufficiently low film charge densities. The dielectric response of the system is then similar to that of bare electrodes with  $\kappa_m \rightarrow \kappa$  (eqn (36)). As a last remark, we note that the magnitude of the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$  is shifted to lower values with decreasing  $c_L^*$  (see the corresponding shift of the maximum in  $\epsilon''(\omega)$ ). It physically underpins that mobile ionic charges need longer times to redistribute according to equilibrium Boltzmann statistics when the local electrostatic potential across the EDL region gets larger.<sup>5</sup>



**Fig. 4** (A) Scaled equilibrium potential distribution across the electric double layer region at the left side of the dielectric cell as a function of film thickness  $d$  under conditions of Fig. 3C, (a)  $d = 50$  nm; (b)  $d = 25$  nm; (c)  $d = 10$  nm and (d)  $d = 5$  nm. (B) Scaled equilibrium potential distribution and spatial distribution of film charges (inset) at the left side of the dielectric cell as a function of  $\alpha/d$  under conditions of Fig. 3D, (a)  $\alpha/d \rightarrow 0$ ; (b)  $\alpha/d = 0.2$  and (c)  $\alpha/d = 2$ .

**3.1.3. Effect of the film thickness  $d$ .** The impact of the film thickness  $d$  on the dielectric response  $\Delta\epsilon'(\omega)$  is illustrated in Fig. 3C. For a fixed frequency  $\omega$ ,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  increases with increasing  $d$  from 5 nm to 50 nm, and reaches asymptotically a constant value for sufficiently large  $d$ . To understand this dependence, we provide in Fig. 4A the equilibrium potential distribution across the EDL region located at the left side of the dielectric cell. For  $\kappa d < 1$  or  $\kappa d \approx 1$ , the Donnan potential is not reached in the film layer and, accordingly  $|y_o| < |y^D|$ . A comparison between Fig. 3C and 4A then indicates that the increase of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with  $d$  goes in pair with that of  $|y_o|$ . For  $\kappa d \gg 1$ , as satisfied for sufficiently large film thickness, we have  $y_o \rightarrow y^D$  so that  $\Delta\epsilon'(\omega)$  reaches the aforementioned plateau value at fixed frequency  $\omega$ . The magnitude of  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  conforms to eqn (37) with  $\kappa_m$  defined in Section 2.7 for the cases  $\kappa d \gg 1$  (Donnan condition), or  $\kappa d < 1$  and  $\kappa d \approx 1$  ( $|y_o| < |y^D|$ ). Varying the film thickness, or, equivalently, the value of the potential  $y_o$ , impacts the magnitude of the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$  (see inset, Fig. 3C) in a way similar to that discussed in Section 3.1.2. The larger  $d$ , the larger the magnitude of the potential deep inside the film and the lower is  $\omega_{\text{diff}}$ .

**3.1.4. Effect of the spatial distribution of fixed charges within the film (eqn (2)).** As detailed in Section 2.1, the heterogeneity in spatial distribution of immobile charges within the film is reflected by the magnitude of the ratio  $\alpha/d$ . The inset of Fig. 4B offers a representation of the charge density distribution across the film/solution interphase at the left side of the cell for different degrees of interphase diffuseness, from  $\alpha/d \rightarrow 0$  (homogeneous distribution) to  $\alpha/d > 0$  (diffuse distribution). The corresponding equilibrium potential distributions are reported in Fig. 4B and are in line with previous work.<sup>17,18,20</sup> In particular, Fig. 4B makes it clear that the equilibrium potential  $y_o$  decreases in magnitude with increasing  $\alpha/d$  and, under the conditions of Fig. 4 where  $\kappa d \gg 1$ ,  $y_o$  reaches the Donnan potential  $y^D$  for  $\alpha/d \rightarrow 0$ . With these elements in mind, the dependence of the dielectric permittivity increment  $\Delta\epsilon'(\omega)$  on  $\alpha/d$  (Fig. 3D), or equivalently on  $y_o$ , becomes similar to that discussed in the previous section when discussing the variation of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with changing electrode surface potential  $y_o$  following a change in film layer thickness  $d$ .

### 3.2. Impact of metal speciation dynamics on the dielectric response of a soft charged ligand film

**3.2.1. General features.** The dynamics of speciation of metal ions at the soft ligand film/electrolyte interphase is governed by the coupling between the mixed diffusion/conduction transports of free mobile ions  $i = \pm, M, A$  (relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$ ), and the local formation/dissociation of complex ML within the film (characteristic frequencies  $\omega_a$  and  $\omega_d$ , respectively). In the situation where ligands L are homogeneously distributed throughout the solution cell (*i.e.* not confined within the film volume), complex ML is said to be dynamic if the rates of interconversion between M and ML are large on the effective time scale of the experiment.<sup>43</sup> Using our nomenclature, this condition is written here

$$\omega_a \gg \omega \text{ and } \omega_d \gg \omega \text{ (dynamic complex ML)}. \quad (40)$$

The other limiting situation is met when the life-times of M and ML are much larger than the operational time scale of the experiment. This case, that refers to static or inert ML complexes, is defined by

$$\omega_a \ll \omega \text{ and } \omega_d \ll \omega \text{ (inert complex ML)}. \quad (41)$$

In the more involved situation where ligands L are confined within a soft ligand particle or a ligand film volume (Fig. 1), the effective rate constants of ML complex formation and dissociation, that we denote from now on as  $\omega_a^*$  and  $\omega_d^*$ , respectively, necessarily involve kinetic contributions, *i.e.*  $\omega_a$  and  $\omega_d$ , but also metal transport contributions that depend on colloidal ligand charge, size, permeability or geometry.<sup>3-6</sup> The dynamic/inert diagnosis for such colloidal metal complexes is then carried out with use of eqn (40) and (41) with replacing therein  $\omega_a$  and  $\omega_d$  by  $\omega_a^*$  and  $\omega_d^*$ , respectively.<sup>3,4</sup> This leads to differences in terms of the dynamic/inert nature and lability between colloidal metal complexes and metal complexes formed with molecular ligands homogeneously distributed in a given sample volume. While analytical and numerical derivations for  $\omega_a^*$  and  $\omega_d^*$  have been reported for soft ligand particles under steady-state metal diffusion across equilibrated electric double layers,<sup>5,10</sup> there is so far no available study for the dynamics of metal speciation in soft charged ligand systems over a time window that ranges from transient, steady-state to fully equilibrated electric double layers. We report below such analysis using the applied frequency field as a time probe for investigating these various dynamic regimes in the context of metal speciation, following the motivations given in Introduction.

In the following sections, the shape and magnitude of the dielectric spectra are therefore discussed for soft ligand film/electrolyte interphases over a large range of  $\omega_a$  and  $\omega_d$  values, in line with the typical  $k_a$  and  $k_d$  magnitudes reported in the literature for a number of metal–ligand pairs.<sup>16</sup> In order to envisage all relevant situations in terms of interplay between complexation kinetics and ion transport dynamics, we shall consider the three following cases: (i)  $\omega_d \ll \omega_{\text{diff}}$ , (ii)  $\omega_d \approx \omega_{\text{diff}}$  and (iii)  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$ . For each case, the film properties  $z_L c_L^*$ ,  $d$ ,  $\alpha/d$ , the bulk concentration of background indifferent electrolyte  $c^*$  and the bulk concentration of metal ions  $c_M^*$  are kept constant. This ensures that the relaxation frequency  $\omega_{\text{diff}}$ , that includes the

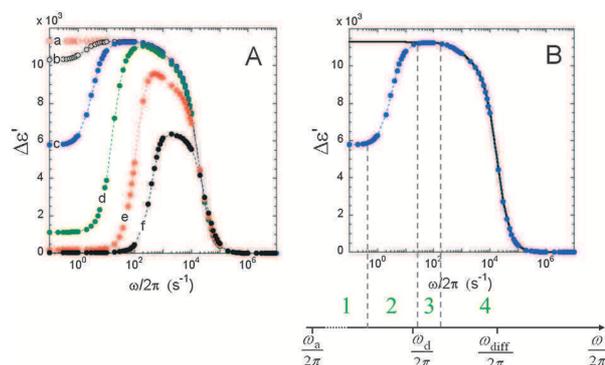
contribution of indifferent ions, free metal ions M and counterions A, is basically identical for all three situations considered, which was quantitatively verified. For each situation,  $\omega_d$  is kept constant and dielectric spectra are reported for various values of  $\omega_a$ .

**3.2.2. Impact of the formation and dissociation of ML complexes on the dielectric response.** We previously showed (Section 3.1) that the value of the dielectric permittivity increment in the low frequency regime is intrinsically determined by the magnitude of the concentration polarization which is itself strongly affected by the electrostatic potential distribution across the film (Fig. 3). In the practical situation where the film is negatively charged with  $z_L = -1$  and metal ions carry a positive charge with  $z_M > 1$ , the conversion of a negatively charged ligand L within the film into a complex ML with valence  $z_L + z_M > 0$  effectively leads to a decrease in the total film charge density. As a result, the magnitude of the potential distribution across the EDL region and thereby the dielectric permittivity increment for the system are possibly diminished to an extent that is controlled by the searched dynamics of metal complexation. Obviously, the dissociation of ML leads to the opposite effect. Before discussing in detail these basic processes for the three dynamic situations detailed above ( $\omega_d \ll \omega_{diff}$ ,  $\omega_d \approx \omega_{diff}$  and  $\omega_d \gg \omega_{diff}$ ), we first provide a strategy to evaluate a 'reference dielectric spectrum' that includes contributions of all ions ( $i = \pm, M, A$ ) in solution, *albeit* in the absence of complexation reaction. Such reference will be shown to help in addressing the coupling between electrodynamic and complexation kinetic processes.

**3.2.3. Deriving a reference curve for the evaluation of  $\omega_{diff}$ .** To correctly address the impact of metal speciation dynamics on dielectric spectra, we need to compare them to a reference curve obtained for the situation where there is no metal complex formation, *i.e.*  $K' = \omega_a/\omega_d = 0$ . To do so, the reference dielectric spectrum associated to a given complexation situation defined by a non-zero  $K'$  value is constructed upon adjustment of the local equilibrium potential distribution across the complexing film (in particular  $y^D$  or  $y_o$  values depending on whether the inequality  $\kappa d \gg 1$  is satisfied or not) until it matches the equilibrium potential distribution evaluated for the case where metal complexation takes place. The adjustment is done *via* changing the volume concentration of film charges,  $c_L^*$ , while maintaining constant the other film properties and electrolyte composition. This reference curves then allows for an appropriate estimation of  $\omega_{diff}$  (see ESI† for further details).

### 3.2.4. Evaluation of the dynamic properties of ML complexes *via* dielectric relaxation spectroscopy

*Case  $\omega_d \ll \omega_{diff}$ .* The frequency-dependent dielectric permittivity increment,  $\Delta\epsilon'(\omega)$ , is displayed in Fig. 5A for  $\omega_d = 10^1 \text{ s}^{-1}$  and various values of  $\omega_a$  ranging from 0 to  $10^2 \text{ s}^{-1}$ . Under the conditions of Fig. 5, the relaxation frequency  $\omega_{diff}$ , as derived from the corresponding reference curve (see Section 3.2.3), is about  $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  over the whole range of  $\omega_a$  values examined. Because of the conjugate nature of the functions  $\Delta\epsilon'(\omega)$  and  $\epsilon''(\omega)$ , we do not report the dielectric loss spectrum that basically reflects the same information than the storage part. A first inspection of Fig. 5A reveals that both shape and magnitude of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  are strongly



**Fig. 5** (A) Dielectric response of a soft ligand film as a function of frequency with  $\omega_d = 10 \text{ s}^{-1} \ll \omega_{diff}$  and with the ML formation rate constants: (a)  $\omega_a \rightarrow 0$ ; (b)  $\omega_a = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; (c)  $\omega_a = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; (d)  $\omega_a = 1 \text{ s}^{-1}$ ; (e)  $\omega_a = 10 \text{ s}^{-1}$ ; (f)  $\omega_a = 10^2 \text{ s}^{-1}$ . The film is homogeneous ( $\alpha/d \rightarrow 0$ ) with thickness  $d = 50 \text{ nm}$  and ligand volume concentration  $c_L^* = 10 \text{ mM}$ . The medium includes free metal ions M and counterions A with  $c_M^* = 0.1 \text{ mM}$ . The bulk concentration of indifferent background 1:1 electrolyte is  $c^* = 1 \text{ mM}$ . Other model parameters:  $H = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_M = D_{\pm} = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $z_M = 2$  and  $z_L = -1$ . (B) The curve (c) is displayed with its reference (full line) and is divided into 4 distinct parts (indicated) for the sake of discussion (see details in the text). Parameters for the reference curve: same as in panel A except  $\omega_a \rightarrow 0$  (or equivalently  $K' = 0$ ).

affected by the dynamic interconversion of M into ML and *vice versa*. The low frequency limit of the permittivity increment,  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$ , is gradually decreased upon increase of  $\omega_a$ , which is the result of the decrease in magnitude of the local equilibrium potential distribution across the ligand film, in line with argument of Section 3.2.2. The second major feature is the appearance and shift of a maximum in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  toward larger frequencies upon increase of  $\omega_a$ . To understand the physical origin of that maximum, we focus on curve (c) of Fig. 5A obtained for  $\omega_a = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This curve is given in Fig. 5B together with its corresponding reference obtained as detailed in Section 3.2.3. The dielectric spectrum may be decomposed into four distinct characteristic regimes when gradually increasing the field frequency  $\omega$  (Fig. 5B).

*Regime 1: the low frequency plateau in dielectric permittivity increment.* In that regime, the solicitation frequency  $\omega$  is small as compared to the three characteristic frequencies  $\omega_a$ ,  $\omega_d$  and  $\omega_{diff}$ . As a result, the electric double layers are fully relaxed (*i.e.* at equilibrium), each metal ion frequently changes from M to ML and *vice versa*. This situation corresponds to that of dynamic metal complexes (Section 3.2.1). Because the association and dissociation of ML are slow as compared to the diffusion of the free species ( $\omega_{a,d} \ll \omega_{diff}$ ), metal speciation is controlled by complexation kinetics thus indicating that the complex ML is non-labile in the low-frequency regime.

*Regime 2:* when increasing the field pulsation,  $\omega$  gets closer to the ML dissociation frequency  $\omega_d$  and becomes significantly larger than the ML association frequency  $\omega_a$ . In turn, the formation of ML, that gives rise to a fall in  $\Delta\epsilon'(\omega)$ , increasingly becomes sluggish while ML dissociation is concomitantly favoured, which leads to an increase in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with increasing  $\omega$ . The ML complex gradually loses its dynamic nature and ultimately becomes inert when  $\Delta\epsilon'(\omega)$  merges with the 'reference

dielectric spectrum' at sufficiently large  $\omega$ . It should be noted that the effective frequency for the formation of ML complex (denoted as  $\omega_a^*$  in Section 3.2.1), corresponding to the frequency where there is an inflection point for  $\Delta\epsilon'(\omega)$  in regime 2, is about 2 orders of magnitude larger than  $\omega_a$ . This is likely so because the presence of an EDL, which is fully relaxed within regime 2, contributes to accelerate the diffusion of free metal ions toward the soft ligand film. This acceleration is promoted by the attractive interaction between metal ions and negatively charged film. Such an effect was recently analysed in detail for steady-state metal speciation in dispersion of charged ligand particles.<sup>3-6</sup>

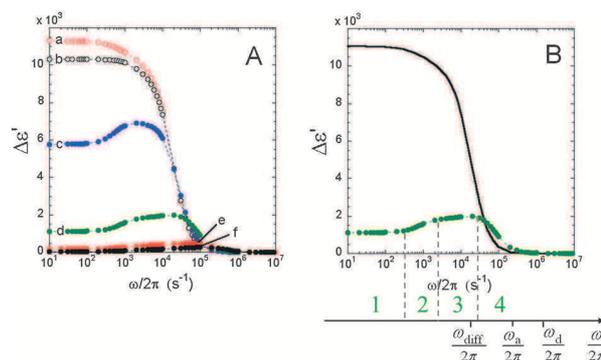
**Regime 3:** the permittivity is constant and is equal to that given by the reference spectrum. The imposed field frequency is now too high to render possible any formation/dissociation of ML. The transport of free ionic species is the only mechanism contributing to  $\Delta\epsilon'(\omega)$ . In this situation, the complex ML is fully inert.

**Regime 4:** the field frequency  $\omega$  now gets closer to the characteristic frequency of ions diffusion transport,  $\omega_{\text{diff}}$ , so that free ionic species can no longer follow the imposed field, which leads to a dramatic drop of the EDL polarization and dielectric permittivity increment to zero value when  $\omega \gg \omega_{\text{diff}}$ . Under such high frequency conditions, the system is basically frozen both in terms of complexation kinetics and ion transport dynamics.

Returning to Fig. 5A, it then becomes clear that the frequencies marking the transitions between the various regimes detailed above are shifted to larger values with increasing  $\omega_a$ . As a result, the low-frequency plateau regime in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  extends over a larger  $\omega$ -range and the maximum in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  is shifted to larger  $\omega$  as well. In addition, the amplitude of that maximum decreases because the effective rate of ML association then becomes comparable to  $\omega_{\text{diff}}$ . In turn, the increase of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with increasing  $\omega$  in the frequency regime 2 becomes strongly impeded by ion transport dynamics, which prevents the dielectric signal from merging to the reference spectrum, except at extreme values of  $\omega$  where the system effectively behaves as if 'frozen'.

**Case  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$ .** Fig. 6A shows  $\Delta\epsilon'(\omega)$  under the condition  $\omega_d = 10^7 \text{ s}^{-1} \gg \omega_{\text{diff}}$  with  $\omega_a$  ranging from 0 to  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . In the equilibrium limit  $\omega \rightarrow 0$ , the dependence of  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  on  $\omega_a$  is rigorously identical to that discussed for the situation  $\omega_d \ll \omega_{\text{diff}}$  (Fig. 5A). The reason is that for two curves identified by the same label in Fig. 5A and 6A, while the respective magnitudes of  $\omega_a$  and  $\omega_d$  differ, the equilibrium stability constant for the ML complex,  $K' = \omega_a/\omega_d$ , is maintained constant. Following the strategy adopted in the previous case, we now report in Fig. 6B the dielectric permittivity increment  $\Delta\epsilon'(\omega)$  corresponding to  $\omega_a = 10^6 \text{ s}^{-1}$  (curve (d)) together with the associated reference dielectric spectrum. Obviously, both curves never merge, which indicates that the complex ML is never inert over the whole range of field frequency examined. The spectrum may be again truncated into 4 distinct regimes with increasing  $\omega$ .

**Regime 1:** similarly to the case discussed in Fig. 5, the ML complex is dynamic in this low frequency regime. In addition, in virtue of the inequalities  $\omega_{\text{diff}} \ll \omega_a < \omega_d$ , we can state that the diffusion of free ions (including M) is slow as compared to the rate of ML formation/dissociation. In turn, the dynamic complex in regime 1 is labile.



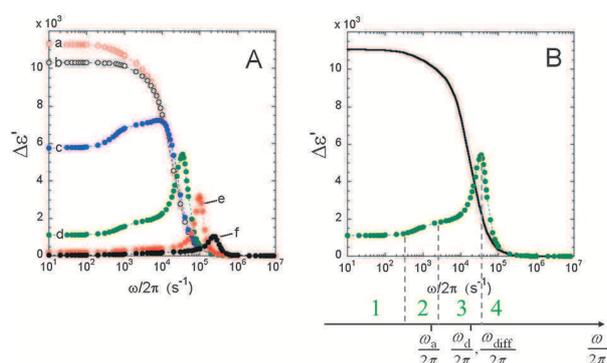
**Fig. 6** (A) Same as in Fig. 5A with  $\omega_d = 10^7 \text{ s}^{-1} \gg \omega_{\text{diff}}$  and with the ML formation rate constants: (a)  $\omega_a \rightarrow 0$ ; (b)  $\omega_a = 10^4 \text{ s}^{-1}$ ; (c)  $\omega_a = 10^5 \text{ s}^{-1}$ ; (d)  $\omega_a = 10^6 \text{ s}^{-1}$ ; (e)  $\omega_a = 10^7 \text{ s}^{-1}$ ; (f)  $\omega_a = 10^8 \text{ s}^{-1}$ . (B) The curve (d) is displayed with its reference (full line) and is divided into 4 distinct parts (indicated) for the sake of discussion (see details in the text). Parameters for the reference curve: same as in panel A except  $\omega_a \rightarrow 0$  (or equivalently  $K' = 0$ ) and  $c_M^* = 9.3 \text{ mM}$ .

**Regimes 2 and 3:** in these range of field frequencies,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  increases and the ML complex loses its dynamic character, in line with the discussion given for regimes 2 and 3 of Fig. 5B. Unlike Fig. 5, the onset of the increase in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with increasing  $\omega$  basically takes place at the same frequency regardless of the magnitude of  $\omega_a$  (see curves (c) to (f) in Fig. 6A). Examination of Fig. 6B reveals that the increase in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  in regimes 2 and 3 is now governed by the diffusion of the free ionic species across the cell, having in mind that ion transport is more limiting than formation/dissociation of the ML complex ( $\omega_{\text{diff}} \ll \omega_a < \omega_d$ ). With further increasing  $\omega$ , the latter comes close to  $\omega_{\text{diff}}$  and the free ion species start having difficulties to follow the oscillations imposed by the applied field. In turn the rate of increase in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with increasing  $\omega$  in regime 3 is distinctly smaller than that observed in regime 2.

**Regime 4:** in this regime where  $\omega > \omega_{\text{diff}}$ , the diffusion of free ion species is strongly impeded and, as a result,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  drops significantly. However, the association/dissociation processes are still operative within this range of frequency ( $\omega_{\text{diff}} \ll \omega_a < \omega_d$ ). With  $\omega$  approaching successively  $\omega_a$  and  $\omega_d$ , ML complexes are formed and dissociated to some extent, which explains why  $\Delta\epsilon'(\omega)$  in regime 4 is systematically larger than that for the case where  $K' = 0$  (reference spectrum) until  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow \infty) \rightarrow 0$ .

Conformably to the above elements, for increasing values of  $\omega_a$  (curves (a) to (f) in Fig. 6A, see caption), the low-frequency plateau regime (regime 1) for  $\Delta\epsilon'(\omega)$  extends over a similar range of field frequencies  $\omega$  while the maximum reached by  $\Delta\epsilon'(\omega)$  in regime 3 decreases and is further shifted to larger frequencies similarly to the situation evoked in Fig. 5.

**Case  $\omega_d \approx \omega_{\text{diff}}$ .** The results corresponding to this situation are given in Fig. 7 with  $\omega_d = 10^5 \text{ s}^{-1} \approx \omega_{\text{diff}}$  and  $\omega_a$  varying in the range 0 to  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . Because the constant  $K' = \omega_a/\omega_d$  is identical in Fig. 5-7, the variations of  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  with  $\omega_a$  are similar to those discussed previously. In addition, it is observed that the dependence of  $\Delta\epsilon'$  on  $\omega$  and  $\omega_a$  are similar to those discussed in regimes 1 and 2 for the previous case



**Fig. 7** (A) Same as in Fig. 5A with  $\omega_d = 10^5 \text{ s}^{-1} \approx \omega_{\text{diff}}$  and with the ML formation rate constants: (a)  $\omega_a \rightarrow 0$ ; (b)  $\omega_a = 10^2 \text{ s}^{-1}$ ; (c)  $\omega_a = 10^3 \text{ s}^{-1}$ ; (d)  $\omega_a = 10^4 \text{ s}^{-1}$ ; (e)  $\omega_a = 10^5 \text{ s}^{-1}$ ; (f)  $\omega_a = 10^6 \text{ s}^{-1}$ . (B) The curve (d) is displayed with its reference (full lines) and divided into 4 distinct parts (indicated) for the sake of discussion (see details in the text). Parameters for the reference curve: same as in panel A except  $\omega_a \rightarrow 0$  and  $c_L^* = 9.6 \text{ m}$ .

where  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$ . This is so because at such low frequencies  $\omega$  and within the range of  $\omega_a$  examined, the increase of  $\Delta\epsilon'(\omega)$  with increasing  $\omega$  is not significantly limited either by complexation kinetics or ion transport dynamics. When comparing curve (d) of Fig. 7 to curve (d) of Fig. 6 (case  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$ ), the ML complex is now less labile in the low-frequency plateau regime (regime 1) because the respective magnitudes of  $\omega_a$ ,  $\omega_d$  and  $\omega_{\text{diff}}$  now underline a stronger limitation of complexation kinetics in the ML complex formation. A major difference between the situations  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$  and  $\omega_d \approx \omega_{\text{diff}}$  is further observed in the frequency regime 3 (Fig. 7B). While  $\Delta\epsilon'(\omega)$  only slightly increases with  $\omega$  in regime 3 for  $\omega_d \gg \omega_{\text{diff}}$  (Fig. 6B),  $\Delta\epsilon'(\omega)$  now grows through a pronounced maximum in this regime when  $\omega_d \approx \omega_{\text{diff}}$ . The presence of that marked maximum is related to the respective positioning of the frequencies  $\omega_a < \omega < \omega_d \approx \omega_{\text{diff}}$  in regime 3. When  $\omega$  gets sufficiently large as compared to  $\omega_a$ , there is no time for the formation of ML so that  $\Delta\epsilon'(\omega)$  dramatically increases. When  $\omega$  becomes comparable to  $\omega_{\text{diff}}$ , impeded ion-transport leads to a strong reduction in  $\Delta\epsilon'(\omega)$  that ultimately goes to zero at sufficiently large  $\omega/\omega_{\text{diff}}$  (regime 4, Fig. 7B). Similarly to Fig. 5 and 6, the increase of  $\omega_a$  goes in pair with a shift toward larger frequencies of the maximum in  $\Delta\epsilon'(\omega)$ . In addition, as for the situation depicted in Fig. 6B, the spectrum  $\Delta\epsilon'(\omega)$  in Fig. 7B never merges with that for the reference situation where  $K' = 0$ .

**3.2.5. Strengths and limits of dielectric relaxation spectroscopy within the framework of metal speciation dynamics at soft ligand film/solution interphases.** The current analysis highlights how coupled chemodynamic and electrodynamic processes may potentially impact both magnitude and shape of the dielectric spectra for a soft ligand film/reactive electrolyte interphase. It is shown that these spectra contain rich physical information on *e.g.* the frequency-dependent inert/dynamic character of the ML complex, and the frequency-dependent kinetic or transport limitations of the ML formation. The relevance of the method is however subjected to the condition that the measured spectra significantly differ from those obtained in the situation

where the electrolyte is inert. In other words, modifications of the electrostatic potential distribution across the film following metal complexation should be large enough to affect concentration polarization. In particular, such modifications are expected to be insignificant when there is a large excess of indifferent ions and/or ligands L as compared to the amount of weakly binding metals in solution ( $K \ll 1$ ). In order to address the sensitivity of the method, we therefore derived in ESI† a criterion for the detection of chemodynamic processes by dielectric relaxation spectroscopy. The final result may be written in the concise form

$$\left| \frac{\kappa_{m,0} - \kappa_m}{\kappa_m} \right| > \theta, \quad (42)$$

where  $\theta$  is a scalar sufficiently large for complexation kinetics to affect dielectric permittivity increment.  $\kappa_m$  is the reciprocal thickness of the equilibrated electric double layer within the film in the presence of reactive metal ions ( $K > 0$ ) and  $\kappa_{m,0}$  is that of the EDL within the film taken in the limit  $K \rightarrow 0$ . The method for evaluating  $\kappa_m$  and  $\kappa_{m,0}$  as a function of the relevant quantities  $c_L^*$ ,  $c^*$ ,  $c_M^*$  and  $K$  is detailed in ESI.† For the sake of illustration, following the acquisition of numerous dielectric spectra evaluated for various sets of these quantities, we estimated  $\theta \approx 10^{-4}$  for  $1 \text{ mM} \leq c^* \leq 10 \text{ mM}$  and  $\theta \approx 10^{-5}$  for  $10 \text{ mM} \leq c^* \leq 100 \text{ mM}$  with  $c_M^*/c^*$  and  $K'$  in the range 0.1 to  $10^{-3}$  under the film Donnan condition ( $\kappa d \gg 1$ ).

## 4. Conclusions

In this theoretical study, we demonstrate the impact of the transient development of electric double layer on the chemodynamic processes that involve reactive metal ions and molecular ligands distributed throughout a soft polyelectrolyte film subjected to a frequency-dependent electric field. The dependence of dielectric permittivity on field frequency is first discussed for a soft charged film in the absence of reactive metal ions, *i.e.* the electrolyte ions are considered as indifferent. The dielectric response is then shown to be affected by the local potential gradient across the film, which generates significant deviation as compared to the situation where films are absent from electrode carriers. The characteristic frequency of relaxation for the system is further found to be mainly controlled by bulk ion concentration and electrode separation distance rather than by the properties characterizing the film itself (thickness, density and distribution of film charges). In a second stage, the introduction in the medium of metal ions able to form complex with charged sites within the film is shown to dramatically affect the dielectric spectra. In detail, basic connections are made between the shape/magnitude of the spectra and the intertwined intra-film metal complexation kinetics and ion transport dynamics. In particular, the signatures of the frequency-dependent dynamic and labile characters of the metal complexes are examined for various ratios between key complex formation/dissociation frequencies and EDL relaxation frequency.

In a forthcoming work, experiments performed on polyanionic film layers exposed to various metal cations will be reported and analyzed on the basis of the here-reported formalism. Future theoretical developments will further

account for polymer chain dynamics, which is required when investigating metal binding at highly flexible chains, and will extend the current formalism to the case of soft ligand particles.

## Glossary of symbols

### Subscripts

Index  $i$  Refers to the free ion species +, -, M and A.  
Index  $k$  Refers to the fixed ion species M and ML.

### Main symbols

$C_{EDL}$	Charging capacitance of the EDL.
$c^*$	Bulk concentration of a $z : z$ electrolyte.
$c_{i,k}^e$	Equilibrium concentration of ion species $i$ and $k$ .
$c_L^*$	Bulk concentration of ligand sites in the film.
$c_L^o$	Spatial profile for the total amount of ligands.
$c_M^*$	Bulk concentration of metal ions.
$d$	Film thickness.
$D_i$	Diffusion coefficient of free ion $i$ .
$H$	Electrode spacing.
$K$	Stability constant for the ML complex.
$K'$	Dimensionless stability constant for the ML complex.
$k_a$	Formation rate constant of the complex ML.
$k_d$	Dissociation rate constant of the complex ML.
$P'$	Real part of electric polarization.
$P''$	Imaginary part of electric polarization.
$R_{sol}$	Electrolyte resistance.
$\tilde{x}$	Scaled axial position.
$y_o$	Equilibrium electrode surface potential.
$y^D$	Dimensionless equilibrium Donnan potential.
$y^e$	Local dimensionless equilibrium electrostatic potential.
$z_L$	Valence of the ligands.
$z_M$	Valence of the metal ions.

### Greek symbols

$\alpha$	Decay length for the spatial distribution of ligand sites within the film.
$\delta c_{i,k}$	First-order field perturbation of the concentration of ions $i$ and $k$ .
$\delta \mu_i$	First-order field perturbation of the electrochemical potential of free ion $i$ .
$\delta y$	First-order field perturbation of local electrostatic potential.
$\Delta \epsilon'$	Dielectric permittivity increment.
$\epsilon$	Dielectric permittivity.
$\epsilon''$	Dielectric loss.
$\epsilon_o \epsilon_r$	Dielectric permittivity of the medium.
$\hat{\Phi}_i$	Dimensionless $\delta \mu_i$ .
$\kappa$	Reciprocal screening Debye layer thickness in solution.
$\kappa_{\pm}$	Contributions of the indifferent ions to $\kappa$ .
$\kappa_A$	Contributions of the metal counter-ions to $\kappa$ .
$\kappa_m$	Reciprocal Debye layer thickness in the film.

$\kappa_{m,0}$	Reciprocal Debye layer thickness in the film in the limit $K \rightarrow 0$ .
$\kappa_M$	Contributions of the metal ions to $\kappa$ .
$\mu_i^e$	Equilibrium electrochemical potential of free ion $i$ .
$\theta$	Scalar.
$\sigma_o$	Electrode surface charge density.
$\omega$	Field angular frequency.
$\omega_a$	Characteristic frequency for the formation of ML complex.
$\omega_a^*$	Effective characteristic frequency for the formation of ML complex.
$\omega_d$	Characteristic frequency for the dissociation of ML complex.
$\omega_d^*$	Effective characteristic frequency for the dissociation of ML complex.
$\omega_{diff}$	Relaxation frequency.
$\omega_{EDL}$	Characteristic frequency for building-up the EDL.
$\omega_H$	Characteristic frequency associated to the transport of the ions across the cell.
$\Psi^e$	Local equilibrium electrostatic potential.

## Acknowledgements

J.F.L.D. acknowledges the French program ANR-07-JCJC-0024-01 PHYSCHEMBACT and the European Union's Seventh Framework Program (Theme 2: Food, Agriculture and Biotechnology) under grant agreement no 244405 (BIOMONAR project) for financing this research.

## References

- 1 J. Buffle, *Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach*, Ellis Horwood, Chichester, 1988.
- 2 A. M. Mota and M. M. Correia Dos Santos, in *Metal Speciation and Bioavailability*, ed. A. Tessier and D. Turner, John Wiley and Sons, New York, 1995, ch. 5.
- 3 J. P. Pinheiro, M. Minor and H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2005, **21**, 8635–8642.
- 4 J. F. L. Duval, J. P. Pinheiro and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 7137–7151.
- 5 J. F. L. Duval, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 2275–2293.
- 6 J. F. L. Duval and S. Qian, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 12791–12804.
- 7 Z. Zhang, J. Buffle and D. Alemani, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 7621–7631.
- 8 H. P. van Leeuwen and J. Buffle, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 7175–7183.
- 9 H. P. van Leeuwen, R. M. Town and J. Buffle, *Langmuir*, 2011, **27**, 4514–4519.
- 10 J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2000, DOI: 10.1021/jp209488v.
- 11 M. Eigen, *Z. Phys. Chem.*, 1954, **1**, 176–200.
- 12 H. P. van Leeuwen, R. M. Town and J. Buffle, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 2115–2121.
- 13 H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2008, **24**, 11718–11721.
- 14 M. C. Tirado, F. J. Arroyo, A. V. Delgado and C. Grosse, *J. Colloid Interface Sci.*, 2000, **227**, 141–146.
- 15 C. Grosse and A. V. Delgado, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 145–159.
- 16 F. M. M. Morel and J. G. Hering, *Principles and applications of aquatic chemistry*, John Wiley, New York, 1993.
- 17 J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2004, **20**, 10324–10336.
- 18 J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2005, **21**, 3247–3258.
- 19 J. F. L. Duval, R. Zimmermann, A. L. Cordeiro, N. Rein and C. Werner, *Langmuir*, 2009, **25**, 10691–10703.
- 20 J. F. L. Duval and H. Ohshima, *Langmuir*, 2006, **22**, 3533–3546.

- 21 E. Rotureau, F. Thomas and J. F. L. Duval, *Langmuir*, 2007, **23**, 8460–8473.
- 22 L. P. Yezek, J. F. L. Duval and H. P. van Leeuwen, *Langmuir*, 2005, **21**, 6220–6227.
- 23 C. Chassagne, D. Bedeaux, J. P. M. van der Ploeg and G. J. M. Koper, *Colloids Surf., A*, 2002, **210**, 137–145.
- 24 L. K. Koopal, W. H. van Riemsdijk, J. C. M. de Wit and M. F. Benedetti, *J. Colloid Interface Sci.*, 1994, **166**, 51–60.
- 25 D. G. Kinniburgh, C. J. Milne, M. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius, L. K. Koopal and W. H. van Riemsdijk, *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 1687–1698.
- 26 R. W. O'Brien and L. R. White, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1978, **74**, 1607–1626.
- 27 H. Ohshima, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1995, **62**, 189–235.
- 28 E. Rotureau and H. P. van Leeuwen, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 12879–12884.
- 29 M. P. Weir, S. Y. Heriot, S. J. Martin, A. J. Parnell, S. A. Holt, J. R. P. Webster and R. A. L. Jones, *Langmuir*, 2011, **27**, 11000–11007.
- 30 J. Lyklema, in *Fundamentals of Colloid and Interface Science*, Academic Press, New York, 1993, ch. 4, vol. I, p. 4.51.
- 31 J. Lyklema, in *Fundamentals of Colloid and Interface Science*, Academic Press, New York, 1993, ch. 4, vol. I, p. 4.36.
- 32 U. Ascher, J. Christiansen and R. D. Russel, *ACM Trans. Math. Software*, 1981, **7**, 209–222.
- 33 R. P. Buck, *J. Electroanal. Chem.*, 1969, **23**, 219–240.
- 34 P. A. Cirkel, J. P. M. van der Ploeg and G. J. M. Koper, *Physica A (Amsterdam)*, 1997, **235**, 269–278.
- 35 J. Lyklema, *Fundamentals of Colloid and Interface Science*, Academic Press, San Diego, 1995, ch. 3, vol. II, p. 3.219.
- 36 P. Debye, *Polar Molecules*, Chemical Catalog Company, New York, 1929.
- 37 K. S. Cole and R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, 1941, **9**, 341–352.
- 38 K. S. Cole and R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, 1942, **10**, 98–105.
- 39 S. Havriliak and S. Negami, *Polymer*, 1967, **8**, 161–210.
- 40 H. Ohshima and T. Kondo, *Biophys. Chem.*, 1990, **38**, 117–122.
- 41 H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **323**, 92–97.
- 42 V. N. Shilov, A. V. Delgado, F. Gonzalez-Caballero, J. Horno, J. J. Lopez-Garcia and C. Grosse, *J. Colloid Interface Sci.*, 2000, **232**, 141–148.
- 43 H. P. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 3743–3748.

## SUPPORTING INFORMATION

### Metal Speciation in Complexing Soft Film Layer :

### A Theoretical Dielectric Relaxation Study of Coupled Chemodynamic and Electrodynamic Interfacial Processes

Jenny Merlin\* and Jérôme F. L. Duval

Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS UMR 7569, 15 avenue du  
Charmois, B.P. 40, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*Determination of the criterion for the detection of coupled chemodynamic and electrodynamic interfacial processes at a soft ligand film/reactive electrolyte interphase by dielectric relaxation spectroscopy (DRS).*

As detailed in the main text, we consider a DRS experiment for the analysis of metal speciation in a complexing soft film layer supporting a ligand concentration  $c_L^*$  and an ionic solution containing a  $z:z$  indifferent electrolyte and reactive metal ions of concentration  $c^*$  and  $c_M^*$ , respectively. A stability constant  $K > 0$  is associated to the complex formed between the ligands L distributed throughout the film layer and free metal ions M. The thickness of the film layer is taken here large enough ( $\kappa d \gg 1$ ) so that, at equilibrium, Donnan potential  $y^D$  is reached in the bulk film layer. For the sake of comprehensiveness, a typical dielectric spectrum corresponding to the above situation is represented in Figure S1 (curve (i) therein, detailed interpretation of the spectra is given in the main text). The impact of chemodynamic processes is in particular reflected by the presence of a maximum in the permittivity increment  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  and the presence of a low magnitude permittivity plateau at low frequencies (see main text for details).

In order to construct a quantitative criterion for the appropriate detection of such a maximum and low frequency limit for the permittivity as a function of the key relevant parameters  $K$ ,  $c_L^*$ ,  $c^*$  and  $c_M^*$ , we adopt the following strategy based on the separate analysis of two distinct situations. First, we assume that metal ions M do not interact with ligands L ( $K \rightarrow 0$ ) while all others parameters (including ionic strength and ligand concentration) are kept unchanged. The resulting Donnan potential is then denoted as  $y^{D,0}$ . Because the formation of complex ML leads to a decrease in the magnitude of the equilibrium potential distribution across the EDL, it comes  $|y^{D,0}| > |y^D|$ . The

35 resulting frequency-dependent permittivity increment,  $\Delta\varepsilon'_{K \rightarrow 0}(\omega)$ , is displayed in Figure S1 (curve (ii)  
36 therein). The second situation considered provides the ‘reference dielectric spectrum’ defined in  
37 §3.2.3. of the main text. The frequency-dependent permittivity increment corresponding to this  
38 reference is denoted as  $\Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega)$ . An example is given in Figure S1 (curve (iii) therein). Briefly, for  
39 this reference, the interconversion of M into ML is not taken into account ( $K \rightarrow 0$ ), but, contrarily to  
40 the previous situation, the Donnan potential in the bulk film layer is set to  $y^{\text{D}}$  *via* appropriate  
41 adjustment of the ligand concentration (see details in §3.2.3. of the main text).

42 Conformably to the results discussed in §3.1.2,  $\Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega)$  is lower than  $\Delta\varepsilon'_{K \rightarrow 0}(\omega)$  at low  
43 frequency, in agreement with the drop (in magnitude) of the equilibrium Donnan potential following  
44 metal complexation in the film layer. Consequently, the searched detection criterion may be written in  
45 the form

$$46 \quad \left| \frac{\Delta\varepsilon'_{K \rightarrow 0}(\omega \rightarrow 0) - \Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega \rightarrow 0)}{\Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega \rightarrow 0)} \right| > \theta, \quad (\text{S1})$$

47 where  $\theta$  is a scalar that must be sufficiently large for metal complexation kinetics to affect the low-  
48 frequency limit of the dielectric permittivity increment. Because there is no interaction between M and  
49 L in both situations considered above,  $\Delta\varepsilon'_{K \rightarrow 0}(\omega \rightarrow 0)$  and  $\Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega \rightarrow 0)$  may be written using eqn  
50 (37) in the main text

$$51 \quad \begin{aligned} \Delta\varepsilon'_{\text{ref}}(\omega \rightarrow 0) &= \varepsilon_r (\kappa_m H / 2 - 1) \\ \Delta\varepsilon'_{K \rightarrow 0}(\omega \rightarrow 0) &= \varepsilon_r (\kappa_{m,o} H / 2 - 1), \end{aligned} \quad (\text{S2a,b})$$

$$52 \quad \text{with} \quad \kappa_{m,o} = \left[ \kappa_{\pm}^2 \cosh(zy^{\text{D},o}) + \kappa_A^2 \exp(y^{\text{D},o}) + \kappa_M^2 \exp(-z_M y^{\text{D},o}) \right]^{1/2}, \quad (\text{S3})$$

53 and  $\kappa_m$  given by eqn (38) in the main text. Combining Eqns (S1) and (S2a,b) provides the following  
54 criterion for the detection of chemodynamic processes by DRS:

$$55 \quad \left| \frac{\kappa_{m,o} - \kappa_m}{\kappa_m} \right| > \theta, \quad (\text{S4})$$

56 recalling that  $\kappa_m H \gg 2$  under conditions of practical interest. Donnan potentials  $y^{\text{D}}$  and  $y^{\text{D},o}$  are then  
57 determined *via* solving the Poisson-Boltzmann equation (eqn (8) in the main text) applied at  $\tilde{x} = 0$  or  
58  $\tilde{x} = \kappa H$ . When the interconversion of ML into M is accounted for, the Donnan potential,  $y^{\text{D}}$ , satisfies

$$59 \quad 2z c^* \sinh(zy^{\text{D}}) + z_M c_M^* (e^{y^{\text{D}}} - e^{-z_M y^{\text{D}}}) - z_L c_L^* - z_M c_L^* \left( 1 + \frac{1}{K c_M^* e^{-z_M y^{\text{D}}}} \right)^{-1} = 0. \quad (\text{S5})$$

60 Unfortunately, an explicit analytical solution of eqn (S5) is not possible. However, in the limit of low  
61 potentials, *i.e.*  $y^{\text{D}} < 1$ , eqn (S5) may be linearized and  $y^{\text{D}}$  is then given by

62 
$$y^D = \left[ \frac{z_M c_L^*}{\lambda} + z_L c_L^* \right] \cdot \left[ \gamma + \frac{z_M^2 c_L^*}{K c_M^* \lambda^2} \right]^{-1} \quad (S6)$$

63 where  $\gamma = \sum_i z_i^2 c_i^*$  and  $\lambda = 1 + 1/Kc_M^*$ . In the absence of metal complexation in the soft ligand film,  
 64 *i.e.* for  $K \rightarrow 0$ , the chemical source term in eqn (S5) vanishes and the equilibrium Donnan potential  $y^{D,0}$   
 65 then satisfies the relationship

66 
$$2z c^* \sinh(z \cdot y^{D,0}) + z_M c_M^* \left( e^{y^{D,0}} - e^{-z_M y^{D,0}} \right) - z_L c_L^* = 0. \quad (S7)$$

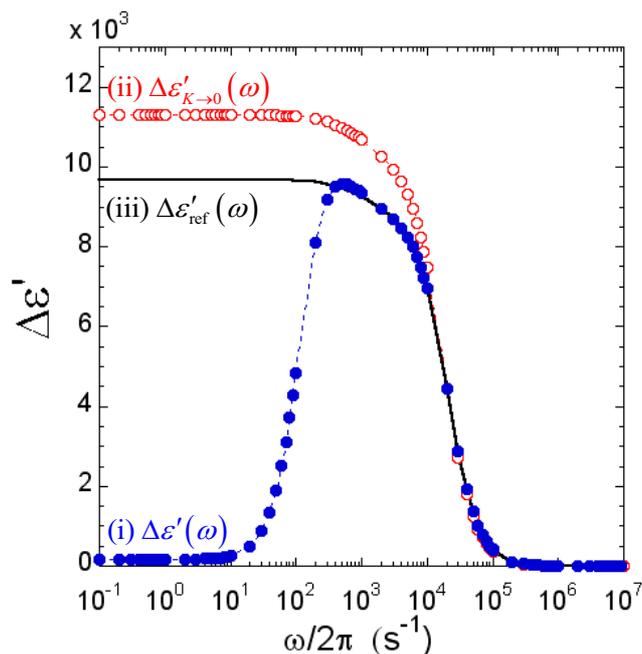
67 This equation may be linearized for low potentials ( $y^{D,0} < 1$ ) and yields

68 
$$y^{D,0} = \frac{z_L c_L^*}{\gamma}. \quad (S8)$$

69 The evaluation of the detection criterion is then performed by combining eqns (S3), (S4), (S6), (S8)  
 70 and eqn (38) in the limit of low Donnan potentials, *i.e.*  $y^{D,0} < 1$  and  $y^D < 1$ . When the two latter  
 71 conditions are not satisfied, eqns (S5) and (S7) must be solved numerically, using standard numerical  
 72 solvers for that purpose.<sup>1</sup> In case Donnan condition is not satisfied (*i.e.*  $\kappa d < 1$  or  $\kappa d \sim 1$ ), the above  
 73 strategy may be adopted *albeit* with reasoning in terms of the equilibrium surface potential  
 74  $y_o = y^\circ(\tilde{x} = 0)$  instead of the Donnan potential. Procedures for evaluation of  $y_o$  were detailed by  
 75 Ohshima.<sup>2</sup> The acquisition of numerous dielectric spectra was performed for various sets of  $K$ ,  $c_L^*$ ,  $c^*$   
 76 and  $c_M^*$  under the condition  $\kappa d \gg 1$ . The data showed a strong sensitivity of the dielectric response  
 77 with respect to the intra-film formation/dissociation of ML complex, even at low values of  $K$  and  $c_M^*$ .  
 78 As a result, we estimated  $\theta \approx 10^{-4}$  for  $1 \text{ mM} \leq c^* \leq 10 \text{ mM}$  and  $\theta \approx 10^{-5}$  for  $10 \text{ mM} \leq c^* \leq 100 \text{ mM}$   
 79 with  $c_M^*/c^*$  and  $K' = Kc_L^*$  in the range  $10^{-3}$  to 0.1.

80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92

93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100  
 101  
 102  
 103  
 104  
 105  
 106



107 **Figure S1.** Dielectric permittivity increment for a soft ligand film as a function of field frequency with  
 108  $\omega_d = 10 \text{ s}^{-1} \square \omega_{\text{diff}}$ , (i)  $K' = 1$ , Donnan potential  $y^D$ ; (ii)  $K \rightarrow 0$ , Donnan potential  $y^{D,0}$ ; (iii)  
 109  $K \rightarrow 0$  and Donnan potential  $y^D$  (reference spectrum, see text for further details). The film is  
 110 homogeneous ( $\alpha/d \rightarrow 0$ ) with a thickness  $d = 50 \text{ nm}$  and ligand concentration  $c_L^* = 10 \text{ mM}$  (i, ii)  
 111 and  $c_L^* = 7.4 \text{ mM}$  (iii). The medium includes free metal ions M and counter-ion A with  $c_M^* = 0.1 \text{ mM}$   
 112 and indifferent electrolyte with  $c^* = 1 \text{ mM}$ . Numerical resolution of eqns (S5-S7) provides  
 113  $y^{D,0} = -1.6$  and  $y^D = -1.4$ . Other model parameters:  $H = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_M = D_{\pm} = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $z_M = 2$   
 114 and  $z_L = -1$ .

115

116 **References.**

117 1. W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery, in *Numerical recipes in Fortran,*  
 118 *The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press: New-York, 2nd ed., 1986.  
 119 2. H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **323**, 92-97.

120

Cette étude théorique permet d'évaluer l'impact de la dynamique d'établissement de la double couche électrique sur les processus liés à la dynamique de spéciation de cations métalliques dans des films ligands mous. Ainsi, elle se démarque de l'ensemble des travaux théoriques disponibles jusqu'alors dans la littérature qui considèrent une relaxation complète de la double couche lors de l'approche des ions métalliques vers les sites ligands et durant la réaction chimique d'interconversion du complexe ML. Pour se faire, le film ligand, initialement à l'équilibre, est soumis à un champ électrique fréquentiel et les variations de l'incrément diélectrique en fonction de cette fréquence sont examinées.

Afin de mieux appréhender l'impact de la spéciation dynamique sur les spectres diélectriques, nous nous sommes d'abord limités à l'analyse de la réponse diélectrique de films minces chargés en contact avec une solution ne comportant que des ions indifférents. Nous avons ainsi démontré que la magnitude de la permittivité diélectrique est essentiellement déterminée par la distribution de potentiel électrostatique dans le film chargé. La fréquence de relaxation associée est quant à elle peu affectée par la présence et les propriétés physico-chimiques (épaisseur, charge, nature diffuse) du film mince. Elle est essentiellement gouvernée par la force ionique du milieu externe et par l'écartement des électrodes.

L'intérêt principal de cette analyse théorique concerne le couplage entre processus électrodynamiques et processus chémodynamiques contrôlé par les fréquences caractéristiques de formation/dissociation du complexe ML et de relaxation de double couche électrique. La présence de métaux susceptibles de réagir avec les sites ligands portés par le film affecte fortement à la fois la magnitude et la forme des spectres diélectriques obtenus. Suivant la fréquence du champ appliqué, la nature inerte/dynamique et la labilité du complexe ML peuvent ainsi être déterminées pour une combinaison quelconque des trois fréquences caractéristiques citées.

En perspectives, cette étude sera étendue afin d'intégrer les processus électrodynamiques pour l'analyse de la dynamique de spéciation de métaux dans des dispersions de particules molles qui portent des sites réactifs au sein de leurs enveloppes perméables. Alors que dans cette étude, le transfert massique des cations métalliques vers/depuis les sites réactifs est assuré par la diffusion et la migration de ces ions, le cas des suspensions de particules colloïdales complexantes soumises à un champ électrique fréquentiel nécessitera la prise en

compte du transport des ions indifférents et métalliques par convection sous l'effet du flux électroosmotique généré par le déplacement de la particule par rapport à la phase liquide. En particulier, nous pouvons anticiper que la taille de la particule contrôlera à la fois la dynamique de complexation et la dynamique de double couche électrique. En effet, une augmentation du rayon de la particule complexante entraîne une spéciation de plus en plus contrôlée par le transport des ions métalliques et une diminution de la fréquence caractéristique associée à l'établissement de la DCE.

D'un point de vue expérimental, les résultats numériques obtenus ici ont permis le développement d'une cellule de mesure diélectrique par le LEM en collaboration avec le *Max Bergmann Center of Biomaterials* (Dresde, Allemagne) pour l'étude expérimentale du couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques dans des films polyélectrolytes minces mous et complexants dont les propriétés physico-chimiques (épaisseur, densité de charge) à l'équilibre sont déjà connues par des analyses expérimentales et théoriques de courant/potentiel d'écoulement. Les résultats expérimentaux en fonction de la fréquence seront traités à l'aide du formalisme théorique développé dans ce chapitre.



## **Chapitre 4**

# **Electrodynamique d'Interphases Molles Multicouches**



Dans le Chapitre 1 nous avons montré la nature dynamique des phénomènes d'interaction électrostatique entre particules colloïdales et des processus gouvernant la spéciation de cations métalliques à des interphases molles ligands. Pour illustration, les interactions électrostatiques entre deux particules chargées interviennent lorsque leurs doubles couches électriques (DCEs) respectives se recouvrent. Ce recouvrement s'accompagne de variations de la distribution de potentiel électrostatique dans les DCEs en interaction et ainsi génère une redistribution des ions libres au voisinage des particules lesquels ions retournent vers une nouvelle configuration suivant les processus de relaxation cités au chapitre 1 (§1.2.3 et §1.4.5). Il est donc important d'intégrer la dynamique des interfaces que forment les surfaces chargées avec leur milieu environnant pour l'analyse de leurs interactions électrostatiques avec d'autres particules colloïdales ou surfaces\*. Pour se faire, les techniques électrocinétiques dynamiques telles que la Spectroscopie de Relaxation Diélectrique (DRS pour Dielectric Relaxation Spectroscopy) ou les mesures électroacoustiques de mobilité dynamique sont fréquemment utilisées. Dans le cadre de ces techniques de mesures, les suspensions colloïdales, initialement à l'équilibre thermodynamique, sont perturbées électriquement par application d'un champ électrique fréquentiel de faible amplitude. La fréquence de la perturbation peut en quelque sorte être perçue comme une sonde temporelle où les processus de relaxation des interphases depuis l'état d'équilibre suite à la dite perturbation sont analysés. L'émergence de ces techniques expérimentales (DRS, mesures électroacoustiques) a été accompagnée par le développement de multiples formalismes théoriques qui tentent de prédire les observables accessibles à savoir la permittivité diélectrique de la suspension particulière (dans le cas de la DRS), et la mobilité dynamique des particules (dans le cas des techniques électroacoustiques). Alors que de nombreux formalismes ont été publiés dans le cas de particules dures homogènes non-perméables aux ions et au solvant [1-8], peu de travaux concernent les particules molles et ce en dépit de leur relevance environnementale [9-11]. Parmi ces quelques travaux, Ahualli *et al.* [11] ont certainement apporté la plus forte contribution. En effet, ces auteurs ont récemment élaboré un modèle théorique pour estimer la mobilité dynamique et la permittivité diélectrique de suspensions concentrées de particules molles. Cependant, comme indiqué dans le §1.4.6. (Chapitre 1) de cette thèse, les particules molles considérées par Ahualli *et al.* se limitent aux

---

\* Voir le Chapitre 1 §1.2.3 pour des informations supplémentaires.

particules de type cœur/couronne enveloppées d'une couche polymérique perméable homogène. Ainsi elles ne sont pas représentatives de multiples (bio)colloïdes rencontrés dans l'environnement qui présentent par nature une hétérogénéité chimique radiale comme les acides humiques, les bactéries, ou les particules virales. Par ailleurs, les (bio)particules comme les bactéries ou les virus sont par essence des paradigmes des systèmes mous multicouches, c'est-à-dire des particules composées (ou non) d'un cœur dur enveloppé de plusieurs couches perméables concentriques dont les propriétés électrostatiques, hydrodynamiques et d'hétérogénéité diffèrent largement [12-13]. Par exemple, les bactéries peuvent manifester à la surface de leur membrane (molle) des structures de tailles et propriétés différentes (*pili*, *fimbriae*, polysaccharides, protéines, capsule). Les virus e.g. de type MS2, peuvent quant-à-eux être assimilés à des particules sphériques poreuses comportant trois couches molles différentes. Le centre de la particule virale est composé de l'ARN, lui-même enveloppé par une deuxième couche d'ARN lié à la capsidie protéique laquelle forme la couche la plus externe.

Les différents éléments ci-dessus ont donc motivé l'étude dans ce chapitre des propriétés électrodynamiques de suspensions concentrées de particules molles multicouches diffuses (hétérogènes) soumises à un champ électrique alternatif de pulsation  $\omega$ . Dans la première partie de ce chapitre, nous détaillerons le modèle théorique avec une description du système étudié et la dérivation des équations fondamentales requises pour l'estimation des observables accessibles par les techniques de DRS et de mesures électroacoustiques (permittivité diélectrique et mobilité dynamique respectivement). Dans la seconde partie nous présenterons et discuterons les résultats théoriques obtenus, en particulier les variations de la permittivité diélectrique et de la mobilité dynamique en fonction de la fréquence  $\omega$  du champ et d'un certain nombre de paramètres électrostatiques, hydrodynamiques, structuraux qui définissent la particule. Ainsi nous évaluerons l'impact sur la dynamique d'établissement de DCE de particules molles multicouches de (i) la densité de charge portée par les couches molles successives de la particule, (ii) leur perméabilité hydrodynamique respective, (iii) leur épaisseur, (iv) l'hétérogénéité spatiale de la distribution de segments polymériques composant chaque couche, (v) le rayon du cœur dur de la particule, (vi) la force ionique du milieu de suspension, (vii) la concentration en particules dans le milieu et (viii) le nombre de couches perméables enveloppant le cœur dur de la particule. Ce chapitre s'achèvera par une section expérimentale décrivant la démarche entreprise pour la mise au point d'un dispositif de DRS.

## 4.1. Théorie.

### 4.1.1. Description du système étudié.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la réponse à un champ électrique alternatif, noté  $\vec{E}(\omega)$ , d'une suspension concentrée de particules sphériques molles et multicouches. Les particules sont constituées d'un cœur dur de rayon  $a$  enveloppé d'une succession de  $N$  couches polyélectrolytes, d'épaisseur  $d_i$ , perméables aux ions et au solvant et dont les propriétés physico-chimiques diffèrent. L'index  $i$  est donné à chaque couche perméable de telle sorte que  $i = 1$  renvoie à la couche la plus interne et  $i = N$  se rapporte à la couche la plus externe (Figure 4.1A).

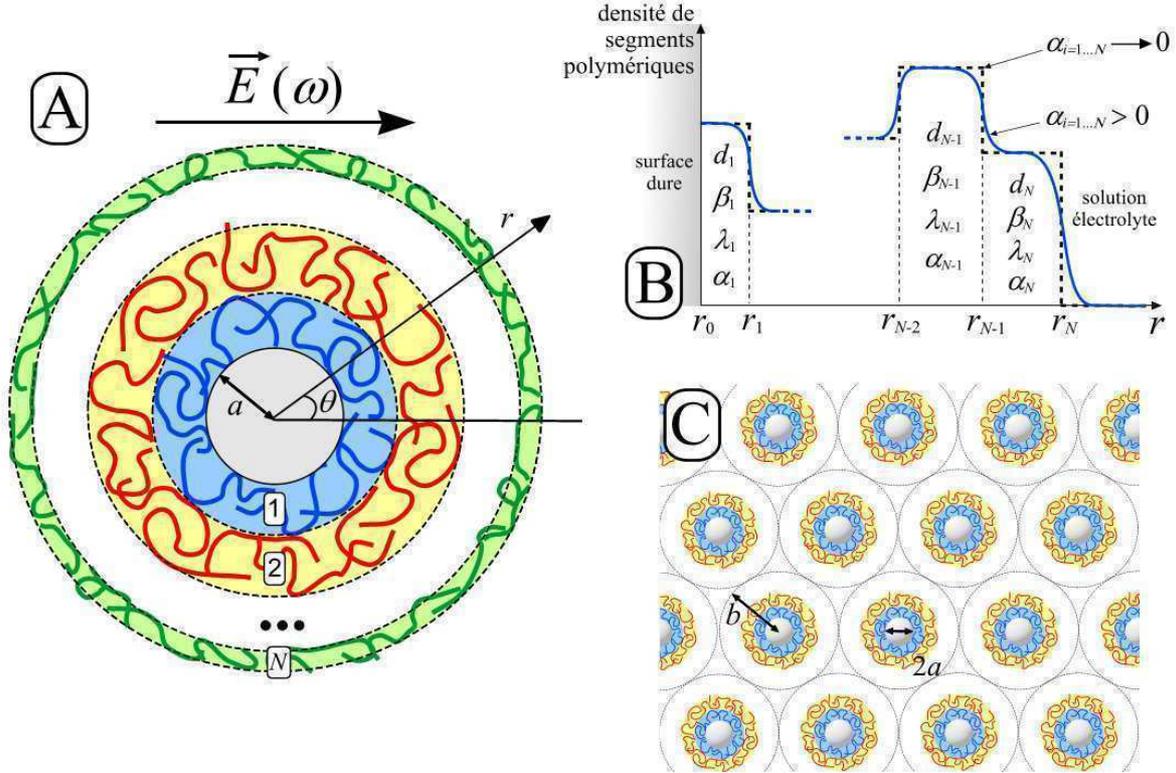
L'originalité de ce travail réside dans la modélisation de l'interphase molle. Ici, l'interphase est constituée de plusieurs couches. La distribution de la densité des segments polymériques est caractérisée par des transitions graduelles entre couches voisines et entre la couche externe et la solution électrolytique (Figure 4.1B). En supposant une distribution homogène des sites chargés le long des segments polymères, la densité de charge volumique dans l'interphase multicouche diffuse  $\rho_{\text{fix}}(r)$  est définie par :

$$\rho_{\text{fix}}(r) = \rho_N^0 g(r), \quad (4.1)$$

avec 
$$g(r) = \chi \left[ \sum_{i=1}^{N-1} (\beta_i - \beta_{i+1}) f_i(r) + f_N(r) \right] \quad (4.2)$$

et 
$$f_i(r) = \frac{1}{2} \left( 1 - \tanh \left[ \frac{r - \sum_{j=1}^i d_j}{\alpha_i} \right] \right), \quad (4.3)$$

où  $\alpha_i$  contrôle la nature diffuse de la distribution de segments polymériques dans chaque couche polyélectrolyte  $i$ . De cette manière lorsque  $\alpha_i \rightarrow 0$ , la couche  $i$  est compacte et la distribution de segments polymère est homogène dans cette couche (voir la courbe pointillée noire dans la Figure 4.1B). A l'inverse, lorsque  $\alpha_i > 0$ , la transition entre les couches  $i/i+1$  est graduelle (courbe bleue dans la Figure 4.1B). Dans l'équation (4.1),  $\rho_N^0$  est la densité de charge volumique de la couche la plus externe. Dans l'équation (4.2), le paramètre sans dimension  $\beta_i$  est défini par  $\beta_i = \rho_i^0 / \rho_N^0$  où  $\rho_i^0$  est la densité volumique de charge dans la  $i$ -ème couche dans la limite d'une distribution homogène des segments polymères ( $\alpha_i \rightarrow 0$ ).



**Figure 4.1.** (A) Représentation schématique d'une particule molle multicouche composée d'un cœur rigide et de  $N$  couches polymériques perméables et soumise à un champ AC  $\vec{E}(\omega)$ . Les coordonnées sphériques  $(r, \theta)$  et la nomenclature adoptée sont également indiquées. (B) Allure de la distribution spatiale homogène (ligne pointillée noire) et diffuse (ligne pleine bleue) de la distribution des segments polymériques depuis le cœur dur de la particule vers la solution électrolytique. (C) Illustration d'une suspension concentrée de particules multicouches selon le modèle de cellule de Kuwabara.

$\rho_N^0$  est par ailleurs définie par  $\rho_N^0 = z_N c_N^*$  où  $z_N$  et  $c_N^*$  sont la valence et la concentration molaire en sites chargés au cœur de la couche externe  $N$ , respectivement. Le dernier paramètre introduit  $\chi$  assure le maintien de la quantité de sites chargés lorsque  $\alpha_i$  varie et s'exprime par :

$$\chi = \sum_{k=1}^N \beta_k \left\{ \left( a + \sum_{i=1}^k d_i \right)^3 - \left( a + \sum_{i=1}^{k-1} d_i \right)^3 \right\} / \left\{ 3 \int_0^\infty r^2 g(r) dr \right\}. \quad (4.4)$$

La friction exercée par ces segments sur les flux électroosmotiques développés autour/au sein de la particule, dénotée  $k(r)$ , est par définition déterminée par la quantité de segments polymères dans chaque couche perméable. Il vient :

$$k(r) = k_N^0 g^H(r), \quad (4.5)$$

avec  $k_N^0$  le coefficient de friction dans la couche externe  $N$  dans la limite  $\alpha_N \rightarrow 0$ . La fonction  $g^H(r)$  est l'équivalent hydrodynamique de  $g(r)$ . Elle s'écrit :

$$g^H(r) = \chi^H \left[ \sum_{i=1}^{N-1} (\beta_i^H - \beta_{i+1}^H) f_i(r) + f_N(r) \right] \quad (4.6)$$

avec, 
$$\chi^H = \sum_{k=1}^N \beta_k^H \left\{ \left( a + \sum_{i=1}^k d_i \right)^3 - \left( a + \sum_{i=1}^{k-1} d_i \right)^3 \right\} / \left\{ 3 \int_0^\infty r^2 g^H(r) dr \right\}. \quad (4.7)$$

Les paramètres sans dimensions  $\beta_i^H (> 0)$  sont donnés par  $\beta_i^H = k_i^0 / k_N^0$  où  $k_i^0$  est le coefficient de friction dans la  $i$ -ème couche dans la limite  $\alpha_i \rightarrow 0$ . Un paramètre de « mollesse » hydrodynamique est associé à  $k(r)$ . Sa distribution spatiale est donnée par :

$$\lambda(r) = (k(r)/\eta)^{1/2} \quad (4.8)$$

Alors que  $\eta$  désigne la viscosité du milieu, la quantité  $\lambda^{-1}(r)$ , qui a la dimension d'une longueur, représente la longueur de pénétration locale des flux électroosmotiques dans l'enveloppe polymérique de la particule. D'après les équations (4.5) et (4.8), il vient :

$$\lambda(r) = \lambda_N^0 \left[ g^H(r) \right]^{1/2}, \quad (4.9)$$

où  $1/\lambda_N^0$  est la distance de pénétration des flux électroosmotiques dans la couche  $N$  lorsque  $\alpha_N \rightarrow 0$ .

Les particules décrites ci-dessus sont dispersées dans un électrolyte indifférent contenant  $M$  espèces ioniques de concentration de cœur  $c_k^*$ , de valence  $z_k$  et de coefficient de friction ionique  $\lambda_k$  avec  $k = 1 \dots M$ . Le milieu ionique est défini par sa viscosité  $\eta$  et sa permittivité diélectrique statique  $\epsilon_0 \epsilon_r$ . Ici, l'enveloppe polymérique contient une quantité suffisamment élevée de solution aqueuse de telle sorte que  $\eta$  et  $\epsilon_0 \epsilon_r$  sont considérées comme constante dans chacune des couches perméables et identiques à leur valeur au cœur de la solution électrolytique. Le coefficient de friction de l'ion  $k$  est relié à la conductivité molaire limite  $\Lambda_k^0$  par la relation :

$$k = 1 \dots M, \quad \lambda_k = \frac{N_A e^2 |z_k|}{\Lambda_k^0}. \quad (4.10)$$

De plus, le formalisme proposé ici permet l'analyse de l'électrocinétique dynamique dans des suspensions fortement concentrées en particules. Afin de modéliser ces suspensions concentrées, le modèle de cellule de Kuwabara est utilisé [14]. Une particule, de rayon  $a$ , est enfermée dans une sphère de rayon  $b$  de telle sorte que la fraction volumique en particule, notée  $\phi$ , dans la cellule est identique à la fraction volumique dans la suspension (Figure 4.1C). La fraction volumique  $\phi$  est donnée par :

$$\phi = \frac{a^3}{b^3}. \quad (4.11)$$

L'avantage de ce modèle est que le problème est très similaire au cas des suspensions diluées. En effet, le problème est résolu pour une seule cellule comprenant une particule. Le système d'équations différentielles à résoudre reste identique aux cas des suspensions diluées, la seule différence étant l'ajout d'équations aux limites à la frontière de la cellule modèle, c'est-à-dire en  $r = b$ . De plus un simple ajustement de  $\phi$  contrôle la concentration en particules depuis une suspension diluée, *i.e.*  $\phi \rightarrow 0$ , vers une suspension concentrée, *i.e.*  $\phi > 0$ .

#### 4.1.2. Equations fondamentales.

##### 4.1.2.1. Distribution de potentiel électrostatique et des différentes espèces ioniques à l'équilibre.

Les techniques électrocinétiques en champ alternatif reposent sur l'application d'un champ électrique  $\vec{E}(\omega)$  sur une suspension de particules initialement laissée à l'équilibre thermodynamique. La première étape de cette étude consiste à évaluer la distribution de potentiel électrostatique depuis la couche perméable la plus interne vers la solution électrolytique en l'absence d'un champ électrique ( $\vec{E}(\omega) = \vec{0}$ ), *i.e.* c'est-à-dire à l'équilibre thermodynamique.

A l'équilibre, la concentration des ions libres  $c_k^e(r)$  dans la solution d'électrolyte et à l'intérieur de la structure molle de la particule suit une distribution de Boltzmann avec :

$$k = 1 \dots M, \quad c_k^e(r) = c_k^* \exp\left(-\frac{z_k F}{RT} \Psi^e(r)\right) = c_k^* \exp(-z_k y^e(r)), \quad (4.12)$$

où  $F$  est la constante de Faraday,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température (en Kelvin).  $\Psi^e(r)$  représente le potentiel électrostatique d'équilibre local et  $y^e(r)$  est le potentiel électrostatique à l'équilibre adimensionnalisé avec  $y^e(r) = F\Psi^e(r)/RT$ .

La distribution spatiale de potentiel électrostatique à l'équilibre à travers l'interphase multicouche satisfait l'équation de Poisson :

$$\nabla^2 \Psi^e(r) = -\frac{\rho_{\text{el}}^e(r)}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} - \frac{\rho_{\text{fix}}(r)}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} = -\frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \sum_{k=1}^M z_k F c_k^e(r) - \frac{\rho_{\text{fix}}(r)}{\varepsilon_0 \varepsilon_r}, \quad (4.13)$$

avec  $\rho_{\text{el}}^e(r)$  la densité de charge volumique des ions libres à l'équilibre.  $\nabla^2$  est l'opérateur Laplacien, dans les coordonnées sphériques, il est donné par  $\nabla^2 \bullet = \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left[ r^2 \frac{d\bullet}{dr} \right]$ .

Finalement, la combinaison des équations (4.12) et (4.13) donne l'équation de Poisson – Boltzmann qui régit les variations de  $y^e(x)$  dans la cellule modèle:

$$\tilde{\nabla}^2 y^e(x) = -\frac{1}{\sum_{k=1}^M z_k^2 c_k^*} \left[ \sum_{k=1}^M z_k c_k^* \exp(-z_k y^e(x)) + z_N c_N^* g(x) \right] \quad (4.14)$$

où nous avons introduit la coordonnée radiale adimensionnelle  $x$  telle que  $x = \kappa(r - a)$  et

l'opérateur Laplacien sans dimension  $\tilde{\nabla}^2 \bullet = \kappa^{-2} \nabla^2 \bullet = \frac{1}{(x + \kappa a)^2} \frac{d}{dx} \left[ (x + \kappa a)^2 \frac{d\bullet}{dx} \right]$ . Le

paramètre  $\kappa$  représente la constante de Debye définie par

$$\kappa = \left[ \sum_{k=1}^M \frac{F^2 z_k^2 c_k^*}{RT \varepsilon_0 \varepsilon_r} \right]^{1/2}. \quad (4.15)$$

La première condition aux limites, associée à l'équation (4.14), est liée à la densité de charge portée à la surface du cœur rigide de la particule  $\sigma_s$ . Elle est donnée par [15]:

$$\left. \frac{dy^e(x)}{dx} \right|_{x=0} = -\frac{F \sigma_s}{\kappa \varepsilon_0 \varepsilon_r RT}. \quad (4.16)$$

La seconde condition intervient à la limite de la cellule modèle, c'est-à-dire en  $r = b$  (ou  $x = \kappa(b - a)$ ). Les conditions de symétrie entre deux cellules voisines sur la distribution de potentiel électrostatique en  $r = b$  donnent :

$$\left. \frac{dy^e(x)}{dx} \right|_{x=\kappa(b-a)} = 0. \quad (4.17)$$

Ainsi, l'association des équations (4.14), (4.16) et (4.17) détermine la distribution spatiale du potentiel électrostatique à l'équilibre depuis l'interphase multicouche jusqu'à la frontière externe de la cellule.

4.1.2.2. *Perturbations de la distribution de potentiel électrostatique et de concentration en ions suite à l'application d'un champ alternatif.*

La suspension de particules, initialement à l'équilibre, est stimulée électriquement. Conformément aux conditions rencontrées lors d'expériences d'électrocinétique dynamique, le champ appliqué,  $Ee^{j\omega t}$ , est dépendant en fréquence et de faible amplitude ( $j$  est un nombre imaginaire tel que  $j^2 = -1$ ,  $\omega$  est la fréquence du champ et  $t$  est le temps). Une faible déviation des distributions de potentiel et de concentrations en ions depuis leurs valeurs initiales d'équilibre est alors créée. Les profils correspondants,  $\Psi(\vec{r}, t)$  (ou  $y(\vec{r}, t) = F\Psi(\vec{r}, t) / RT$ ) et  $c_k(\vec{r}, t)$ , dépendent de la fréquence  $\omega$  et du temps  $t$ . Ils peuvent être exprimés comme la somme de leur valeur à l'équilibre ( $\Psi^e(r)$  et  $c_k^e(r)$ ) et d'un terme « de perturbation » du premier ordre proportionnel à la magnitude du champ appliqué ( $\delta\Psi(\vec{r})$  et  $\delta c_k(\vec{r})$ ) :

$$\Psi(\vec{r}, t) = \Psi^e(r) + \delta\Psi(\vec{r})e^{j\omega t}, \quad (4.18)$$

$$k = 1 \dots M, \quad c_k(\vec{r}, t) = c_k^e(r) + \delta c_k(\vec{r})e^{j\omega t}. \quad (4.19)$$

La correction de perturbation étant très faible devant la quantité correspondante d'équilibre, il est légitime de négliger les termes de correction de second ordre de telle sorte que le produit de deux termes du premier ordre peut être également éliminé.

Ici, l'objectif est de déterminer la vitesse de la particule et les termes de perturbation  $\delta\Psi(\vec{r})$  et  $\delta c_k(\vec{r})$  en fonction de la fréquence du champ appliqué. Pour cela, le formalisme est basé sur (i) la détermination de la vitesse du fluide (relative à la particule) en utilisant l'équation de Navier – Stokes, (ii) la détermination des distributions en ions dans l'interphase multicouche sur la base des équations de continuité pour chaque espèce ionique et (iii) la détermination du potentiel électrostatique dans l'interphase multicouche à partir de l'équation de Poisson – Boltzmann non-linéarisée. L'ensemble de ces équations différentielles couplées est résolu pour chaque fréquence  $\omega$ .

Ces équations sont obtenues sous la condition que les segments polymères et les charges qu'ils portent restent immobiles après application du champ électrique. Cette hypothèse est valide lorsque les segments polymères sont rigides, c'est-à-dire que leur module d'Young est suffisamment élevé de manière à ce que les stresses électriques/osmotiques subis par la particule ne génère pas de déformation significative de sa structure molle.

(i) *Dérivation de l'équation de Navier – Stokes.*

L'équation de Navier - Stokes détermine les variations de la vitesse du fluide (relative à la particule)  $\vec{u}(\vec{r}, t) = \vec{u}(\vec{r}) e^{j\omega t}$ . Elle est donnée par :

$$\eta \nabla \times \nabla \times \vec{u}(\vec{r}, t) + \nabla P(\vec{r}, t) + \rho_{el}(\vec{r}, t) \cdot \nabla \Psi(\vec{r}, t) + k(r) \vec{u}(\vec{r}, t) = \rho_m \frac{\partial \vec{u}(\vec{r}, t)}{\partial t}, \quad (4.20)$$

où  $P(\vec{r}, t)$  représente la pression,  $\rho_{el}(\vec{r}, t)$  est la densité de charge due aux espèces ioniques mobiles et  $\rho_m$  est la densité massique du fluide. Dans l'équation (4.20), nous avons considéré un flux de fluide incompressible autour d'une particule chargée (terme de source électrostatique  $\rho_{el}(\vec{r}, t) \cdot \nabla \Psi(\vec{r}, t)$ ) caractérisé par un nombre de Reynolds faible (terme non-linéaire d'inertie dans l'équation complète de Navier – Stokes négligé).

En suivant la méthodologie proposée par Ohshima [16], le troisième terme dans l'équation (4.20) peut être réécrit sous la forme :

$$\rho_{el}(\vec{r}, t) \nabla \Psi(\vec{r}, t) = - \sum_{k=1}^M \delta \mu_k(\vec{r}) \nabla c_k^e(r) e^{-j\omega t} + \rho_{el}^e(r) \nabla \Psi^e(\vec{r}) + \nabla (\rho_{el}^e(r) \delta \Psi(\vec{r})) e^{-j\omega t}. \quad (4.21)$$

L'équation (4.21) fait apparaître la fonction  $\delta \mu_k(\vec{r})$ , c'est-à-dire le terme de perturbation associé au potentiel électrochimique de l'ion  $k$ . Il est défini par :

$$k = 1 \dots M, \quad \mu_k(\vec{r}, t) = \mu_k^e + \delta \mu_k(\vec{r}) e^{j\omega t} \quad (4.22)$$

$$\text{avec} \quad \mu_k(\vec{r}, t) = \mu_k^\infty + z_k F \Psi(\vec{r}, t) + RT \ln c_k(\vec{r}, t), \quad (4.23)$$

où  $\mu_k^\infty$  est le potentiel électrochimique standard de l'ion  $k$ .  $\delta \mu_k(\vec{r})$  est lié aux termes de perturbation  $\delta \Psi(\vec{r})$  et  $\delta c_k(\vec{r})$  par la relation :

$$k = 1 \dots M, \quad \delta \mu_k(\vec{r}) = z_k F \delta \Psi(\vec{r}) + RT \frac{\delta c_k(\vec{r})}{c_k^e(r)}. \quad (4.24)$$

La combinaison des équations (4.20) et (4.21) donne la relation suivante :

$$\begin{aligned} \eta \nabla \times \nabla \times \vec{u}(\vec{r}, t) + \nabla P(\vec{r}, t) - \sum_{k=1}^M \delta \mu_k(\vec{r}) \nabla c_k^e(r) e^{-j\omega t} + \rho_{el}^e(r) \nabla \Psi^e(\vec{r}) \\ + \nabla (\rho_{el}^e(r) \delta \Psi(\vec{r})) e^{-j\omega t} + k(r) \vec{u}(\vec{r}, t) = \rho_m \frac{\partial \vec{u}(\vec{r}, t)}{\partial t} \end{aligned} \quad (4.25)$$

Pour résoudre l'équation de Navier - Stokes, il est judicieux de calculer le rotationnel de l'équation (4.25) afin d'en éliminer le deuxième, le quatrième et le cinquième terme. Il vient :

$$\eta \nabla \times \nabla \times \nabla \times \vec{u}(\vec{r}) - \sum_{k=1}^M \nabla \delta \mu_k(\vec{r}) \nabla c_k^e(r) + \nabla \times (k(r) \vec{u}(\vec{r})) = j \omega \rho_m \nabla \times \vec{u}(\vec{r}). \quad (4.26)$$

En considérant la symétrie sphérique du système étudié,  $\vec{u}(\vec{r})$  peut être écrit sous la forme vectorielle :

$$\vec{u}(\vec{r}) = \left( -\frac{2}{r} h(r) E \cos \theta, \frac{1}{r} \frac{d}{dr} (r h(r)) E \sin \theta, 0 \right) \quad (4.27)$$

avec  $h(r)$  une fonction inconnue ne dépendant que de la coordonnée radiale  $r$ . Les termes  $\delta \Psi(\vec{r})$  et  $\delta \mu_k(\vec{r})$  peuvent être définis sous la forme :

$$\delta \Psi(\vec{r}) = \delta \psi(r) \vec{E} \cdot \frac{\vec{r}}{\|\vec{r}\|} = \delta \psi(r) E \cos \theta \quad (4.28)$$

et

$$\delta \mu_k(\vec{r}) = -z_k F \varphi_k(r) \vec{E} \cdot \frac{\vec{r}}{\|\vec{r}\|} = -z_k F \varphi_k(r) E \cos \theta. \quad (4.29)$$

Toujours en adoptant la stratégie d'Ohshima, une fonction dépendante de la coordonnée  $r$ , notée  $\xi(r)$ , satisfait la relation :

$$\nabla^2 [\xi(r) E \cos \theta] = L \xi(r) \cdot E \cos \theta. \quad (4.30)$$

avec  $\xi(r) = h(r)$ ,  $\delta \psi(r)$  ou  $\varphi_k(r)$ . L'opérateur  $L$  est défini par :

$$L \bullet = \frac{d^2 \bullet}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{d \bullet}{dr} - \frac{2}{r^2} \bullet. \quad (4.31)$$

Enfin, en associant les équations (4.8), (4.9), (4.26), (4.27), (4.29) et (4.30), l'équation différentielle satisfaite par  $h(r)$  est donnée par

$$L([\gamma^2] h(r)) - G(r) = -\frac{F}{\eta r} \frac{dy^e(r)}{dr} \sum_{k=1}^M \left\{ z_k^2 c_k^* e^{-z_k y^e(r)} \varphi_k(r) \right\} \quad (4.32)$$

où nous avons introduit le paramètre  $\gamma$  tel que

$$\gamma^2 = \frac{j \omega \rho_m}{\eta} \quad (4.33)$$

et la fonction  $G(r)$  avec:

$$G(r) = (\lambda_N^0)^2 \left\{ g^H(r) L h(r) + \frac{dg^H(r)}{dr} \left( \frac{dh(r)}{dr} + \frac{h(r)}{r} \right) \right\}. \quad (4.34)$$

Pour une suspension de particules enveloppées d'une seule couche molle d'épaisseur  $d_1$  et caractérisée par une distribution spatiale homogène de la densité de segments polymères

chargés, l'équation (4.32) se réduit à l'équation différentielle dérivée par Ahualli *et al.* où  $G(r) = 0$  dans la solution électrolyte (*i.e.*  $d_1 < r < b$ ) et  $G(r) = (\lambda_1^0)^2 Lh(r)$  dans la couche molle (*i.e.*  $a < r < d_1$ ) [11]. De plus, en régime statique (particules soumises à un champ électrique DC), le paramètre  $\gamma^2$  disparaît de l'équation (4.32). On retrouve alors les précédents résultats de Duval et Ohshima pour la détermination de la mobilité électrophorétique de particules molles monocouches diffuses [15].

(ii) *Dérivation de l'équation de continuité pour chaque espèce ionique k.*

Suite à l'application d'un champ électrique, un ion  $k$  atteint une vitesse locale  $\vec{v}_k(\vec{r}, t)$  par rapport à la particule. Ce flux d'ions est provoqué par le flux de liquide (contribution convective dérivant de  $\vec{u}(\vec{r}, t)$ ) et par le gradient du potentiel électrochimique de l'ion  $k$  (contribution diffusive). On a alors :

$$k = 1 \dots M, \quad \vec{v}_k(\vec{r}, t) = \vec{u}(\vec{r}, t) - \frac{1}{N_A \lambda_k} \nabla \mu_k(\vec{r}, t). \quad (4.35)$$

L'équation de continuité de l'ion libre  $k$  assure la conservation du nombre total d'ions  $k$  dans la cellule modèle. Elle est donnée par :

$$k = 1 \dots M, \quad \frac{\partial c_k(\vec{r}, t)}{\partial t} = -\nabla \cdot (c_k(\vec{r}, t) \vec{v}_k(\vec{r}, t)) \quad (4.36)$$

Pour un fluide incompressible, *i.e.*  $\nabla \cdot \vec{u}(\vec{r}, t) = 0$ , l'association des équations (4.19), (4.22), (4.35) et (4.36) donne :

$$k = 1 \dots M, \quad j\omega \delta c_k(\vec{r}) = -\nabla \cdot \left\{ c_k^c(r) \vec{u}(\vec{r}) - \frac{1}{N_A \lambda_k} c_k^c(r) \nabla \delta \mu_k(\vec{r}) \right\}. \quad (4.37)$$

Finalement, en intégrant les équations (4.27)-(4.29) et (4.30) dans la relation précédente, l'équation différentielle déterminant la potentiel électrochimique des ions  $k$  s'écrit :

$$k = 1 \dots M, \quad L\varphi_k(r) + \kappa^2 \gamma_k^2 (\varphi_k(r) + \delta\psi(r)) = \frac{dy^c(r)}{dr} \left[ z_k \frac{d\varphi_k(r)}{dr} - 2 \frac{\lambda_k}{e} \frac{h(r)}{r} \right] \quad (4.38)$$

où la constante complexe sans dimension  $\gamma_k^2$  est donnée par

$$k = 1 \dots M, \quad \gamma_i^2 = \frac{j\omega \lambda_i N_A}{\kappa^2 RT}. \quad (4.39)$$

(iii) *Dérivation de l'équation de Poisson.*

La dernière équation différentielle gouvernant l'électrodynamique de suspensions colloïdales est l'équation de Poisson. Elle relie les termes de perturbation du potentiel électrostatique et des concentrations en ions mobiles par :

$$\nabla^2 \delta\Psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_{k=1}^M z_k F \delta c_k(\vec{r}). \quad (4.40)$$

En incorporant les équations (4.24), (4.28)-(4.30), l'équation de Poisson devient :

$$L\delta\psi(r) = \frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_{k=1}^M \left\{ \frac{z_k^2 F^2}{RT} c_k^e(r) [\varphi_k(r) + \delta\psi(r)] \right\}. \quad (4.41)$$

(iv) *Détermination des conditions aux limites.*

Comme souligné par Ahualli *et al.* [2], le point clé déterminant la résolution de ce problème est le choix de conditions aux limites appropriées. Ici notre choix s'est porté sur les conditions utilisées par Bradshaw-Hajek *et al.* pour l'étude de la réponse diélectrique de dispersions concentrées de particules dures sphériques [7-8], ces conditions étant elles-mêmes basées sur le travail de Ahualli *et al.*

Conditions satisfaites à la surface du cœur dur de la particule (en  $r = a$ ).

A la surface du cœur dur de la particule, les conditions hydrodynamiques imposent une vitesse du fluide nulle, c'est-à-dire  $u(a) = 0$ . En annulant les premier et second éléments dans le vecteur (4.27), nous obtenons les deux conditions :

$$h(a) = 0 \quad (4.42)$$

et 
$$\left. \frac{dh(r)}{dr} \right|_{r=a} = 0. \quad (4.43)$$

Par définition, aucun ion ne peut pénétrer à l'intérieur du cœur dur de la particule. La vitesse de l'ion  $k$   $\vec{v}_k(\vec{r}, t)$  satisfait la relation  $\vec{v}_k(\vec{r}, t) \cdot \vec{e}_n = 0$ , où  $\vec{e}_n$  est le vecteur unitaire normal à la surface. En utilisant les équations (4.29) et (4.35), il vient :

$$k = 1 \dots M, \quad \left. \frac{d\varphi_k(r)}{dr} \right|_{r=a} = 0. \quad (4.44)$$

La dernière condition fait intervenir la continuité du potentiel électrostatique et du déplacement électrique normal à la surface de la particule dure. Il vient :

$$\left. \frac{d\delta\psi(r)}{dr} \right|_{r=a} - \frac{\varepsilon_p}{\varepsilon_r a} \delta\psi(a) = 0 \quad (4.45)$$

où  $\varepsilon_p$  est la permittivité diélectrique du cœur dur de la particule.

Conditions satisfaites à la frontière externe de la cellule modèle (en  $r = b$ )

Afin de déterminer les conditions aux limites en  $r = b$ , les différentes quantités  $f(\vec{r})$  (avec  $f(\vec{r}) = \delta\Psi(\vec{r})$ ,  $\delta c_k(\vec{r})$  ou  $P(\vec{r})$ ) sont moyennées sur le volume  $V$  de la cellule modèle.

On a alors

$$\langle f(\vec{r}) \rangle = \frac{1}{V} \int_V f(\vec{r}) dV. \quad (4.46)$$

La première contrainte provient de la définition du champ électrique avec  $\langle -\nabla \delta\Psi(\vec{r}) \rangle = \langle E \rangle$ . Il vient :

$$\delta\psi(b) = -b. \quad (4.47)$$

En admettant que le déplacement de la particule suite à l'application du champ n'est attribué qu'au phénomène d'électrophorèse, et non à la diffusiophorèse (déplacement de particules dû à un gradient de concentration), la seconde condition est donnée par  $\langle \nabla \delta c_k(\vec{r}) \rangle = 0$ . Il vient :

$$\varphi_k(b) = b. \quad (4.48)$$

De plus, le déplacement de la particule est d'origine électrophorétique et ne provient pas d'une contribution convective, résultat d'un gradient de pression. On a alors  $\langle \nabla P(\vec{r}) \rangle = 0$ . Il vient  $P(b) = 0$ , d'où :

$$\left. \frac{d}{dr} \left[ r(L + \gamma^2) h(r) \right] \right|_{r=b} = \frac{\rho_{el}^e(b)}{\eta} b + \mu_e \gamma^2 b \quad (4.49)$$

avec  $\mu_e$  la mobilité dynamique qui est proportionnelle à la vitesse de la particule et ne dépend pas de l'amplitude du champ appliqué. A partir de résultats expérimentaux obtenus *via* la méthode ESA (Electrokinetic Sonic Amplitude – voir le §1.3.1 du Chapitre 1), O'Brien *et al.* ont démontré que la mobilité dynamique déterminée théoriquement est en accord avec les résultats expérimentaux seulement si le moment macroscopique moyen par unité de masse est

nul, c'est-à-dire si la relation  $(1/\rho V) \int_V \rho(\vec{r}) \vec{u}(\vec{r}) dV = 0$  est vérifiée (avec la densité massique  $\rho = \rho_p$  dans le cœur dur et  $\rho = \rho_m$  dans le reste de la cellule) [17-18]. Il vient :

$$\mu_e = \frac{2h(b)}{b} \left( 1 + \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m} \right)^{-1}, \quad (4.50)$$

La dernière condition utilisée provient de la condition de Kuwabara, *i.e.*  $(\nabla \times \vec{u}(\vec{r}))|_{r=b} = 0$ . En utilisant la définition vectorielle de  $\vec{u}(\vec{r})$  (équation(4.27)), on obtient :

$$Lh(r)|_{r=b} = 0. \quad (4.51)$$

(v) *Adimensionnalisation des équations différentielles et conditions aux limites*

Le système d'équations différentielles (équations (4.32), (4.38) et (4.41)) et de conditions aux limites (équations (4.42)-(4.45), (4.47)-(4.49) et (4.51)) doit être résolu numériquement. Pour se faire, les équations citées sont réécrites afin de faire intervenir les quantités sans dimensions :

$$\begin{aligned} \delta\tilde{\psi}(r) &= \kappa\delta\psi(r) ; \tilde{\varphi}_k(r) = \kappa\varphi_k(r) ; \tilde{h}(r) = \frac{\kappa F \eta}{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT} h(r) ; \tilde{\lambda}_N^0 = \kappa^{-1} \lambda_N^0 \\ \tilde{\gamma}^2 &= \kappa^{-2} \gamma^2 ; \tilde{L}\bullet = \kappa^{-2} L\bullet = \frac{d^2 \bullet}{dx^2} + \frac{2}{x + \kappa a} \frac{d\bullet}{dx} - \frac{2}{(x + \kappa a)^2} \bullet \end{aligned} \quad (4.52)$$

Finalement, on obtient les équations différentielles :

$$\left\{ \begin{aligned} &\tilde{L}([\tilde{L} + \tilde{\gamma}^2] \tilde{h}(x)) - (\tilde{\lambda}_N^0)^2 \left\{ g^H(x) \tilde{L}\tilde{h}(x) + \frac{dg^H(x)}{dx} \left( \frac{d\tilde{h}(x)}{dx} + \frac{\tilde{h}(x)}{x + \kappa a} \right) \right\} \\ &= - \frac{1}{\sum_{k=1}^M z_k^2 c_k^*} \frac{1}{x + \kappa a} \frac{dy^e(x)}{dx} \sum_{k=1}^M \left\{ z_k^2 c_k^* e^{-z_k y^e(x)} \tilde{\varphi}_k(x) \right\}, \\ &L\tilde{\varphi}_k(x) + \gamma_k^2 (\tilde{\varphi}_k(x) + \delta\tilde{\psi}(x)) = \frac{dy^e(r)}{dr} \left[ z_k \frac{d\tilde{\varphi}_k(x)}{dr} - 2 \frac{\lambda_k}{e} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}{F \eta} \frac{\tilde{h}(x)}{x + \kappa a} \right], \\ &\tilde{L}\delta\tilde{\psi}(x) = \frac{1}{\sum_{k=1}^M z_k^2 c_k^*} \sum_{k=1}^M \left\{ z_k^2 c_k^* e^{-z_k y^e(x)} [\tilde{\varphi}_k(x) + \delta\tilde{\psi}(x)] \right\}, \end{aligned} \right. \quad (4.53)$$

accompagnées des conditions aux limites en  $x = 0$

$$\left\{ \begin{array}{l} \left. \frac{d\delta\tilde{\psi}(x)}{dx} \right|_{x=0} - \frac{\varepsilon_p}{\kappa a \varepsilon_r} \delta\tilde{\psi}(0) = 0, \\ \left. \frac{d\delta\tilde{\varphi}_k(x)}{dx} \right|_{x=0} = 0, \\ \tilde{h}(0) = 0, \\ \left. \frac{d\tilde{h}(x)}{dx} \right|_{x=0} = 0, \end{array} \right. \quad (4.54)$$

et en  $x = \kappa(b-a)$

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta\tilde{\psi}(\kappa(b-a)) = -\kappa b, \\ \tilde{\varphi}_k(\kappa(b-a)) = \kappa b, \\ \left. \tilde{L}\tilde{h}(x) \right|_{x=\kappa(b-a)} = 0, \\ \left. \frac{d}{dx} \left[ (\tilde{L} + \tilde{\gamma}^2) \tilde{h}(x) \right] \right|_{x=\kappa(b-a)} = \frac{\sum_{k=1}^M z_k^2 c_k^* e^{-z_k y^e(\kappa(b-a))}}{\sum_{k=1}^M z_k^2 c_k^*} + \tilde{\gamma}^2 \frac{2\tilde{h}(\kappa(b-a))}{\kappa b} \left( -1 + \left( 2\phi \frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m} \right)^{-1} \right). \end{array} \right. \quad (4.55)$$

#### 4.1.2.3. Evaluation de la mobilité électrophorétique et de la permittivité diélectrique.

Le but de ce travail est de déterminer la mobilité dynamique  $\mu_e(\omega)$  et la permittivité diélectrique  $\varepsilon^*(\omega)$  en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué.  $\mu_e(\omega)$  et  $\varepsilon^*(\omega)$  sont toutes deux des quantités complexes telles que :

$$\mu_e(\omega) = \mu_e'(\omega) + j\mu_e''(\omega), \quad (4.56)$$

$$\text{et} \quad \varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega) = \Delta\varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega) + \varepsilon_r. \quad (4.57)$$

$\mu_e'(\omega)$  et  $\varepsilon'(\omega)$  sont les parties réelles de la mobilité et de la permittivité, respectivement.  $\mu_e''(\omega)$  et  $\varepsilon''(\omega)$  sont les parties imaginaires de la mobilité et de la permittivité (au signe près). La quantité  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  est appelé *incrément diélectrique*. Il est défini comme  $\Delta\varepsilon'(\omega) = \varepsilon'(\omega) - \varepsilon_r$  et est utilisé en lieu et place de  $\varepsilon'(\omega)$ .

Comme mentionné dans la section précédente, la mobilité dynamique  $\mu_c(\omega)$  est donnée par l'équation (4.50). En adoptant la nomenclature spécifiée en (4.52),  $\mu_c(\omega)$  devient :

$$\mu_c(\omega) = \frac{2\tilde{h}(\kappa(b-a))}{\kappa b} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}{F\eta} \left( 1 + \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m} \right)^{-1}. \quad (4.58)$$

Pour évaluer la réponse diélectrique de la suspension colloïdale, il est nécessaire de déterminer au préalable la conductivité dynamique  $K^*(\omega)$  dans la cellule. Elle est définie comme la somme de la contribution du fond ionique,  $K_m^*(\omega)$ , et de la contribution de la particule (et de sa double couche),  $\Delta K^*(\omega)$  :

$$K^*(\omega) = K_m^*(\omega) + \Delta K^*(\omega). \quad (4.59)$$

$K_m^*(\omega)$  est simplement donnée par :

$$K_m^*(\omega) = \sum_{k=1}^M \frac{z_k^2 e F c_k^*}{\lambda_k} - j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r. \quad (4.60)$$

$K^*(\omega)$  est la constante de proportionnalité entre le champ moyenné  $\langle E \rangle$  et le courant local dans la cellule  $\langle i \rangle$ . En suivant à la lettre la méthodologie de Bradshaw-Hajek *et al.* [8],  $K^*(\omega)$  devient :

$$K^*(\omega) = -\mu_c(\omega) \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m} \sum_{k=1}^M z_k F c_k^* e^{-z_k y^e(\kappa(b-a))} + \sum_{k=1}^M \left[ \frac{z_k^2 e F c_k^*}{\lambda_k} e^{-z_k y^e(\kappa(b-a))} \frac{d\tilde{\varphi}_k(x)}{dx} \Big|_{x=\kappa(b-a)} \right] + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{d\delta\tilde{\psi}(x)}{dx} \Big|_{x=\kappa(b-a)}. \quad (4.61)$$

En utilisant (4.59)-(4.61), il vient :

$$\Delta K^*(\omega) = \sum_{k=1}^M \frac{z_k^2 e F c_k^*}{\lambda_k} \left[ e^{-z_k y^e(\kappa(b-a))} \frac{d\tilde{\varphi}_k(x)}{dx} \Big|_{x=\kappa(b-a)} - 1 \right] - \mu_c(\omega) \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{\rho_m} \sum_{k=1}^M z_k F c_k^* e^{-z_k y^e(\kappa(b-a))} + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r \left[ \frac{d\delta\tilde{\psi}(x)}{dx} \Big|_{x=\kappa(b-a)} + 1 \right]. \quad (4.62)$$

A l'image de la mobilité et de la permittivité, la conductivité  $k^*(\omega)$  (avec  $k^*(\omega) = K^*(\omega)$ ,  $\Delta K^*(\omega)$  ou  $K_m^*(\omega)$ ) est une quantité complexe telle que :

$$k^*(\omega) = k'(\omega) + jk''(\omega) \quad (4.63)$$

où  $k'(\omega)$  et  $k''(\omega)$  sont la conductivité réelle et imaginaire, respectivement.  $K^*(\omega)$  est liée à la permittivité diélectrique par :

$$K^*(\omega) = K'(\omega) + jK''(\omega) = K'(\omega \rightarrow 0) + \omega\epsilon_0\epsilon''(\omega) - j\omega\epsilon_0(\Delta\epsilon'(\omega) + \epsilon_r) \quad (4.64)$$

Finalement, à partir des équations (4.59),(4.60), (4.63) et (4.64),  $\Delta\epsilon'(\omega)$  et  $\epsilon''(\omega)$  sont données par :

$$\Delta\epsilon'(\omega) = -\frac{\Delta K''(\omega)}{\omega\epsilon_0}, \quad (4.65)$$

et 
$$\epsilon''(\omega) = \frac{\Delta K'(\omega) - \Delta K'(\omega \rightarrow 0)}{\omega\epsilon_0}. \quad (4.66)$$

#### 4.1.3. Résolution numérique des équations.

La complexité du système d'équations différentielles non-linéaires (4.53) associé aux conditions aux limites (4.54) et (4.55) nécessite une résolution numérique du problème pour obtenir les fonctions  $\delta\tilde{\psi}(x)$ ,  $\tilde{\varphi}_k(x)$  et  $\tilde{h}(x)$  pour chaque fréquence  $\omega$ , et le potentiel électrostatique local à l'équilibre  $y^e(x)$ . Pour cela, nous avons développé un algorithme de calcul FORTRAN qui permet la résolution du système d'équations différentielles sur une large gamme de fréquence (depuis quelques Hz jusqu'à MHz) en intégrant dans le programme le logiciel COLSYS développé pour la résolution de problèmes à valeurs limites *via* la méthode de collocation [19]. Les solutions sont assimilées à des fonctions polynômiales estimées automatiquement par le programme avec une précision choisie à  $10^{-4}$ . La mobilité dynamique  $\mu_e(\omega)$ , l'incrément diélectrique et la perte diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  et  $\epsilon''(\omega)$  sont ensuite déterminées *via* les équations (4.58), (4.62), (4.65) et (4.66).

Ce formalisme permet l'évaluation de la réponse diélectrique de suspensions concentrées de particules sphériques molles multicouches et diffuses sans restrictions sur la taille de la particule (rayon du cœur dur et épaisseurs des couches molles), sa charge, la perméabilité hydrodynamique et le nombre de couches polymériques enveloppant le cœur dur de la particule.

Les résultats numériques ont été validés en les comparant avec d'autres résultats disponibles dans la littérature. D'une part les variations en fréquence de la permittivité (ou

conductivité) et de la mobilité reproduisent avec succès les résultats de différentes études sur l'électrocinétique en champ alternatif de suspensions de particules dures [7] ou de particules molles monocouches et homogènes [11]. La distribution diffuse et multicouche des segments polymères a également été testée avec succès. Nous avons vérifié que la mobilité dynamique lorsque  $\omega \rightarrow 0$  est identique à la mobilité électrophorétique calculée par Langlet *et al.* [12] dans leur analyse des propriétés électrocinétiques de (bio)particules polyélectrolytes constituées de 3 couches distinctes. Ainsi, ce modèle est à ce jour le plus complet car il intègre les situations de suspensions concentrées/diluées de particules dures, de type cœur/couronne ou entièrement polyélectrolytes. De plus les (bio)particules en suspension présentent une structure molle hétérogène composée de plusieurs couches concentriques de caractéristiques différentes.

#### 4.2. Résultats et Discussions.

Comme indiqué dans le chapitre 1 (§1.3.), la réponse à un champ électrique d'une dispersion de particules colloïdales est régie par les processus de polarisation de double couche électrique et par leurs temps (ou fréquences) de relaxation respectifs. Ces processus et leurs impacts sur les spectres fréquentiels de mobilité dynamique et de permittivité ont été présentés en détail dans le §1.3 dans le cadre de suspensions de particules dures. Pour rappel, deux processus de relaxation gouvernent la polarisation d'une particule et de sa DCE face à l'application d'un champ électrique :

(i) *la relaxation  $\alpha$*  avec pour fréquence caractéristique  $\omega_\alpha \approx 2D / a^2$  (4.67)

Cette relaxation est associée à l'établissement d'une polarisation de concentration autour de la particule chargée. Pour des particules dont le rayon varie entre 1nm et 1 $\mu$ m, la relaxation  $\alpha$  intervient à des fréquences comprises entre le kHz et le GHz. La permittivité diélectrique reflète la polarisation de concentration. Ainsi, plus la polarisation est importante, plus la permittivité diélectrique l'est également.

(ii) *la relaxation de Maxwell-Wagner (MW)* avec  $\omega_{MW} \approx 2D / \kappa^{-2}$  (4.68)

La relaxation MW provient de la migration/diffusion des ions dans la DCE. Pour des forces ioniques comprises entre 1mM et 100mM, la relaxation MW se produit à des

fréquences de l'ordre du MHz jusqu'au GHz. Contrairement à la permittivité diélectrique, la mobilité dynamique est très sensible à cette polarisation.

Une troisième fréquence de relaxation  $\omega_1$ , liée aux effets d'inertie de la particule se déplaçant dans un fluide visqueux, détermine les variations de la mobilité dynamique. Elle est définie par :

$$\omega_1 = 2\eta / \rho_m a^2 \quad (4.69)$$

Pour des particules de rayon compris entre 1nm et 1  $\mu\text{m}$  et suspendues dans un fluide de densité  $\rho_m \approx 1000 \text{ kg.m}^3$  et de viscosité  $\eta \approx 10^{-3} \text{ Pa.s}$ ,  $\omega_1$  peut varier du  $10^6 \text{ Hz}$  jusqu'à  $10^{12} \text{ Hz}$ . Pour plus d'informations sur les différents mécanismes mis en jeu, le lecteur peut se reporter au Chapitre 1 §1.3 de ce travail. Bien que ceux-ci soient décrits dans le cadre de particules rigides, les processus restent similaires dans le cas des particules molles.

L'objectif de cette section est d'examiner les spectres de mobilité dynamique et de permittivité diélectrique sur les bases des phénomènes de relaxation  $\alpha$  et MW. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux suspensions de particules enveloppées de deux couches perméables suspendues dans un électrolyte symétrique 1 : 1 de concentration  $c^* = c_+^* = c_-^*$ , avec  $c_+^*$  et  $c_-^*$  les concentrations en cations et en anions, respectivement, au cœur de la solution d'électrolyte. Nous analyserons les effets, sur les spectres obtenus, (i) de la densité de charge des particules, (ii) de leur perméabilité hydrodynamique, (iii) de la taille de leur cœur dur, (iv) de l'épaisseur des couches polymériques, (v) du degré d'hétérogénéité des couches polymériques, (vi) de la concentration en électrolyte et (vii) de la concentration en particules dans la suspension. Nous terminerons avec l'étude de l'impact du nombre de couches polymériques enveloppant le cœur dur des particules sur les variations de la mobilité dynamique et de l'incrément diélectrique en fonction de la fréquence.

#### **4.2.1. Impact de la charge de la couche interne, de la perméabilité hydrodynamique de l'enveloppe polymérique et de la force ionique.**

##### *4.2.1.1. Réponse diélectrique.*

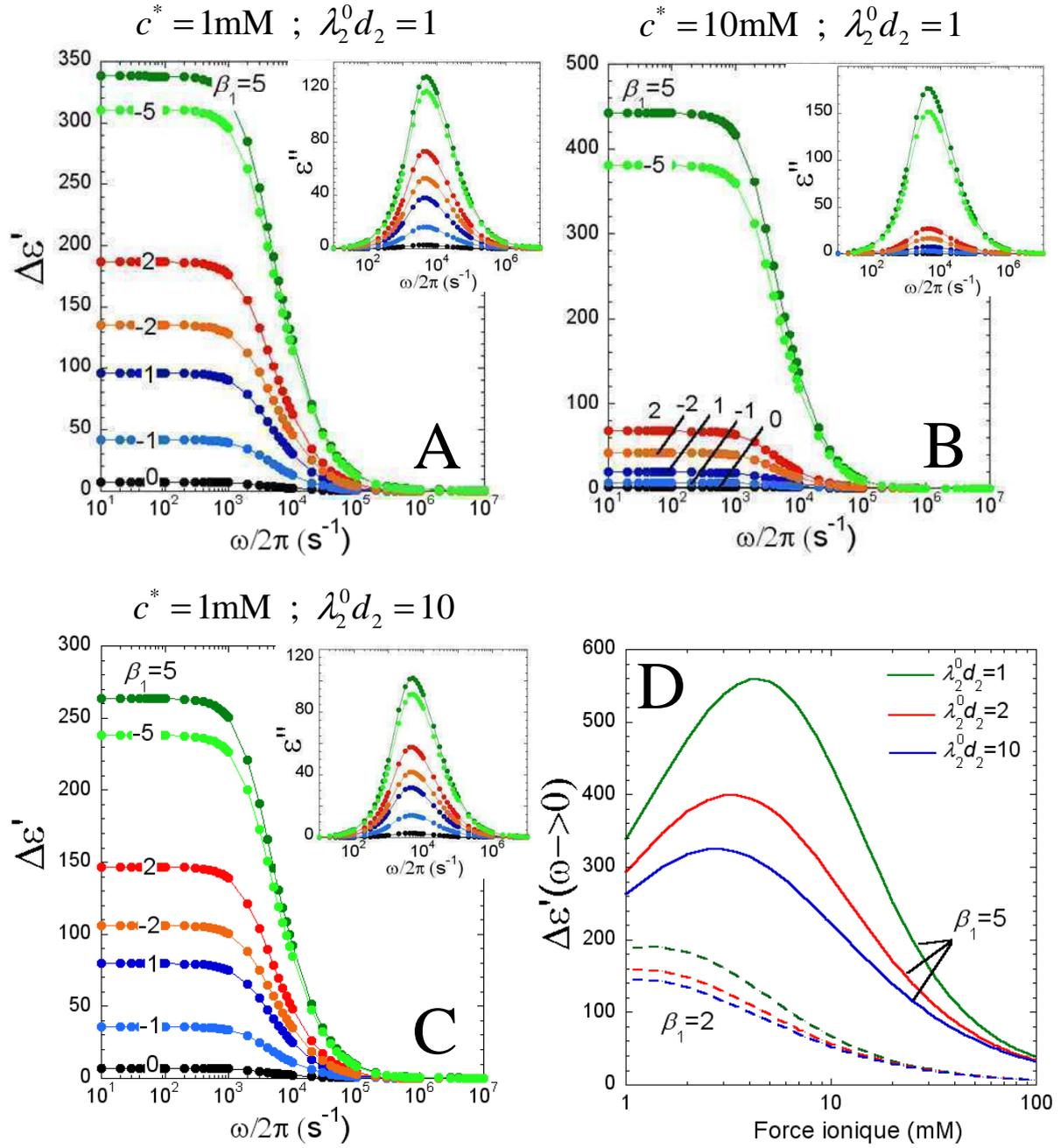
Les variations, en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$ , de l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  dans des suspensions diluées de particules entourées de deux couches molles de caractéristiques

différentes dans lesquelles les segments polymères sont distribués de façon homogène ( $\alpha_{i=1,2} \rightarrow 0$ ) sont représentées dans la figure 4.2A-C. Chaque courbe correspond à une densité de charge différente de la couche perméable interne avec  $\rho_1^0 = \beta_1 \rho_2^0$  (couche 1 d'épaisseur  $d_1 = 20$  nm). La charge de la couche externe est fixée avec  $\rho_2^0/F = -10$  mM (couche 2 d'épaisseur  $d_2 = 5$  nm). Les encarts représentent les variations de la perte diélectrique  $\varepsilon''(\omega)$  correspondantes. Les paramètres utilisés pour l'acquisition des spectres diélectriques non indiqués dans la légende de la figure sont présentés dans le tableau 4.1.

Température	$T = 298$ K
Permittivité relative du milieu	$\varepsilon_r = 78,54$
Permittivité relative de la particule	$\varepsilon_p = 2,0$
Viscosité du milieu	$\eta = 0,954 \cdot 10^{-3}$ Pa.s
Densité du milieu	$\rho_m = 0,997$ g.cm <sup>-3</sup>
Densité de la particule	$\rho_p = 1,05$ g.cm <sup>-3</sup>
Charge de surface de la particule	$\sigma_s = 0$
Conductivité molaire limite du cation	$\Lambda_+^0 = 7,35$ cm <sup>2</sup> Ω <sup>-1</sup>
Conductivité molaire limite de l'anion	$\Lambda_-^0 = 7,146$ cm <sup>2</sup> Ω <sup>-1</sup>

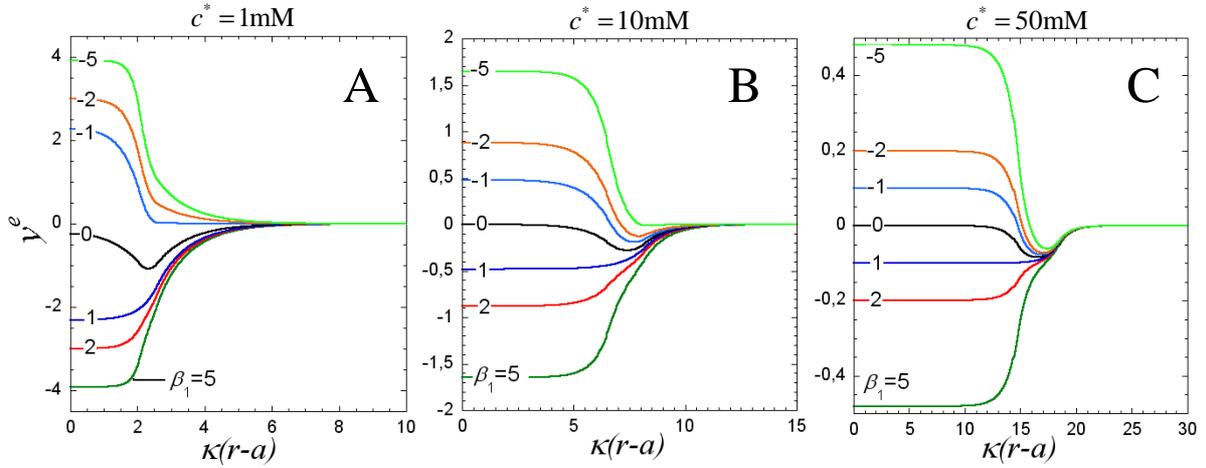
**Tableau 4.1.** Données utilisées pour les calculs numériques dans cette étude.

Intéressons-nous aux spectres diélectriques présentés dans la Figure 4.2A. Les particules sont dispersées dans une solution de concentration  $c^* = 1$  mM et sont caractérisées par une mollesse hydrodynamique  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  avec  $\beta_1^H = |\beta_1|$ . Ceci implique que les flux électroosmotiques pénètrent dans l'intégralité de la couche 2. La charge de la couche interne est variée *via* le paramètre sans dimension  $\beta_1$  avec  $-5 \leq \beta_1 \leq 5$ . Lorsque  $\beta_1 < 0$ , la charge de la couche interne est opposée à la charge de la couche externe. Dans notre cas, elle est positive.



**Figure 4.2.** (A-C) Variations, en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$ , de l'incrément diélectrique  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  et de la perte diélectrique  $\varepsilon''(\omega)$  (encarts) dans une suspension de particules enveloppées de deux couches molles pour différents rapports  $\beta_1 = \rho_1^0 / \rho_2^0$  (indiqué) avec (A)  $c^* = 1\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ ; (B)  $c^* = 10\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  et (C)  $c^* = 1\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 10$ . (D) Variations de la magnitude de l'incrément diélectrique au plateau basse fréquence  $\Delta\varepsilon'(\omega \rightarrow 0)$  en fonction de la force ionique pour différents rapports  $\beta_1$  et degrés de perméabilité  $\lambda_2^0 d_2$  (indiqué). Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\rho_2^0 / F = 10\text{mM}$ ;  $d_1 = 20\text{nm}$ ;  $d_2 = 5\text{nm}$ ;  $a = 300\text{nm}$ ;  $\phi = 0,01$ ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$ ;  $z = 1$ ;  $\beta_1^H = |\beta_1|$ .

Chaque spectre diélectrique manifeste une décroissance continue de la permittivité depuis un haut plateau à  $\omega \rightarrow 0$ , signe que la DCE est complètement relaxée, jusqu'à atteindre une valeur nulle lorsque la fréquence d'oscillation du champ est trop rapide pour permettre la migration des ions dans les DCEs intra/extra-particulaires et la polarisation de la particule. Un examen plus précis de la figure révèle que la magnitude de l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  est reliée à la charge totale portée par l'ensemble de l'enveloppe polymérique (couche 1 + couche 2). Cette charge totale est donnée par  $Q_{\text{tot}} = \sum_{i=1,2} V_i \beta_i \rho_2^0$  (où  $V_i$  est le volume de la couche  $i$ ). Ici,  $|Q_{\text{tot}}|$  est maximale pour le rapport  $\beta_1 = 5$ , par conséquent, à fréquence fixée,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  est elle aussi maximale. Lorsque la charge de la couche interne diminue ( $\beta_1 = 2, 1$  puis  $0$ ),  $\Delta\epsilon'(\omega)$  diminue également et atteint un minimum pour  $\beta_1 = 0$  où la charge totale  $|Q_{\text{tot}}|$  est minimale. Une diminution supplémentaire de  $\beta_1$  ( $\beta_1 = -1, -2$  puis  $-5$ ) entraîne une inversion du signe et une augmentation de la magnitude de la charge de la couche 1 et de la charge totale. Il en résulte une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega)$ . Ce résultat provient du fait que la magnitude de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  est directement reliée à la polarisation de concentration. Pour rappel, une augmentation de la charge totale (qu'elle soit positive ou négative) entraîne une augmentation du potentiel électrostatique local et de la quantité de contre-ions à l'équilibre dans l'interphase molle (voir les profils de potentiel électrostatique à l'équilibre représentés dans la figure 4.3A). Ces contre-ions participent à l'établissement de la polarisation de concentration autour de la particule. Une augmentation de leur concentration locale dans l'interphase provoque une polarisation de concentration plus importante autour de la particule et, finalement, une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega)$ . L'examen des variations de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (encart de la figure 4.2A) nous montre que la fréquence caractéristique associée à la relaxation sondée par la DRS, *i.e.* la relaxation  $\alpha$ , est indépendante de la charge totale portée par l'enveloppe perméable. Pour rappel, cette fréquence de relaxation est matérialisée par un maximum dans les variations de  $\epsilon''(\omega)$ . Ce résultat est en accord avec l'équation (4.67) (établie dans le cadre de suspensions de particules rigides) qui stipule que le temps d'établissement de la concentration de polarisation est équivalent au temps nécessaire aux espèces ioniques pour se déplacer d'un côté à l'autre de la particule.



**Figure 4.3.** Profils de potentiels électrostatiques à l'équilibre  $y^e(\tilde{x})$  depuis la surface dure de la particule vers le milieu externe pour des particules enveloppées de deux couches molles immergées dans un électrolyte de concentration  $c^*$  à 1mM (panel A), 10mM (panel B) et 50mM (panel C) pour différents rapports  $\beta_1 = \rho_1^0 / \rho_2^0$  (indiqué). La couche perméable externe (couche 2) est matérialisée par la largeur de la « bosse » observée dans le cas  $\beta_1 = 0$ . Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\rho_2^0 / F = -10\text{mM}$  ;  $d_1 = 20\text{nm}$  ;  $d_2 = 5\text{nm}$  ;  $a = 300\text{nm}$  ;  $\phi = 0,01$  ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$  ;  $z = 1$  ;  $\beta_1^H = |\beta_1|$ .

La comparaison entre les Figures 4.2A et 4.2B permet d'étudier l'impact de la force ionique du milieu sur la réponse diélectrique. Les spectres diélectriques ont été obtenus dans les mêmes conditions à l'exception de la force ionique avec  $c^* = 1\text{ mM}$  (Fig. 4.2A) et  $c^* = 10\text{ mM}$  (Fig. 4.2B). A une fréquence donnée, la comparaison des deux figures révèle deux comportements différents de la réponse diélectrique lorsque  $c^*$  augmente.

Tout d'abord, considérons le cas où  $\beta_1$  est compris dans la fourchette  $[-2; 2]$ . Une augmentation de la force ionique entraîne un meilleur écrantage des charges fixes dans les couches molles par les ions libres qui entraîne une diminution du potentiel électrostatique  $y^e(x)$  dans l'interphase (voir Fig. 4.3B-C). Ceci génère une diminution de la polarisation de concentration autour de la particule et finalement une diminution de  $\Delta\epsilon'(\omega)$ . Ceci est en accord avec les résultats obtenus où nous observons, pour  $\omega$  et  $\beta_1$  fixés, une diminution de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  lorsque la force ionique augmente de  $c^* = 1\text{ mM}$  (Fig. 4.2A) à  $c^* = 10\text{ mM}$  (Fig. 4.2B). Cette tendance est également illustrée dans la Figure 4.2D qui représente les variations de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  pour  $\omega \rightarrow 0$  en fonction de  $c^*$  pour différentes densités de charge dans la couche 1 ( $\beta_1 = 2$  et 5) et différents degrés de perméabilité hydrodynamique ( $\lambda_2^0 d_2 = 1, 2$  et 10). A  $\lambda_2^0 d_2$

donné et pour  $\beta_1 = 2$  (lignes pointillées),  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  diminue graduellement lorsque  $c^*$  augmente jusqu’à atteindre une valeur presque nulle pour  $c^* > 100\text{mM}$ .

A l’inverse, pour  $\beta_1 = -5$  ou  $5$ , la comparaison des Figures 4.2A et 4.2B révèle une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  lorsque  $c^*$  augmente de  $1\text{mM}$  à  $10\text{mM}$ . Pour plus d’informations, nous avons représenté dans la Figure 4.2D les variations de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  en fonction de  $c^*$  pour  $\beta_1 = 5$  (lignes pleines). D’après la figure lorsque  $c^*$  augmente,  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  augmente jusqu’à atteindre un maximum pour  $c^* \approx 4\text{mM}$  puis diminue et atteint une valeur proche de zéro (non visible ici). Cette augmentation de permittivité est due aux larges potentiels électrostatiques  $y^e(x)$  à travers l’interphase lorsque  $c^* < 4\text{mM}$  (Fig. 4.3A). Expliquons ce résultat. Après application du champ électrostatique  $\vec{E}(\omega)$ , le nuage ionique autour/à l’intérieur de la particule molle se déforme et la particule se polarise suivant les processus de relaxation décrits précédemment (§1.4. Chapitre 1). Un champ électrostatique de polarisation est alors créé, celui-ci étant dirigé dans le sens inverse du champ appliqué. Plus le potentiel électrostatique  $y^e(x)$  dans l’interphase est élevé, plus l’amplitude du champ de polarisation est importante. Ce champ induit va alors contrer et diminuer les effets du champ appliqué. C’est pourquoi, une augmentation de  $c^*$  entraîne une polarisation de concentration plus importante et une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  dans la limite où  $c^* < 4\text{mM}$ . A partir de  $c^* \approx 4\text{mM}$ , lorsque  $c^*$  augmente, le potentiel  $y^e(x)$  diminue de telle sorte que l’amplitude du champ induit diminue également et sa contribution dans la réponse diélectrique devient négligeable. Par conséquent, le comportement de la réponse diélectrique de la suspension est similaire au cas  $\beta_1 = -2$  avec une diminution de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  lorsque  $c^*$  augmente.

Toujours en accord avec l’équation (4.67), la fréquence de relaxation  $\omega_\alpha / 2\pi$  ne dépend pas de la force ionique du milieu et reste égale à  $5.10^3\text{s}^{-1}$  quelles que soient la charge de la particule et la concentration en électrolyte. Cette observation confirme que la relaxation sondée par la DRS est bien la relaxation  $\alpha$ .

La comparaison entre les Figures 4.2A et 4.2C permet d’étudier l’impact de la mollesse hydrodynamique des couches perméables enveloppant les particules sur leur réponse diélectrique. Les spectres diélectriques ont été obtenus dans les mêmes conditions à

l'exception du paramètre  $\lambda_2^0 d_2$  qui augmente  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  (Fig. 4.2A) à  $\lambda_2^0 d_2 = 10$  (Fig. 4.2C). Ceci implique que, pour la Figure 4.2A, les flux électroosmotiques, développés autour/au sein de la particule pendant leur mouvement sous l'effet du champ électrique, pénètrent dans l'intégralité de la couche 2 d'épaisseur  $d_2$  et, pour la Figure 4.2C, la distance de pénétration des flux électroosmotiques dans la particule, estimée à  $1/\lambda_2^0$ , est plus limitée avec  $1/\lambda_2^0 = d_2/10$ .

La comparaison entre les Figures 4.2A et 4.2C montre que, à  $\beta_1$  fixé,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  augmente lorsque  $\lambda_2^0 d_2$  diminue. Commentons ce résultat. Pour  $\lambda_2^0 d_2 = 10$ , la particule est peu perméable. Les flux électroosmotiques pénètrent faiblement dans la couche 2 où les variations de potentiel électrostatiques d'équilibre sont faibles en magnitude. A l'inverse, pour  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ , la particule présente une large perméabilité hydrodynamique. Les flux électroosmotiques pénètrent en profondeur dans la couche 2 jusqu'à la limite de la couche 1 où les potentiels sont plus importants. Par conséquent, les distributions de potentiel sondées par les flux augmentent en magnitude lorsque la mollesse hydrodynamique de la particule augmente. A une fréquence fixée, on observe donc une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  lorsque  $\lambda_2^0 d_2$  diminue. Cette tendance est confirmée dans la Figure 4.2D où on observe, à  $\beta_1$  et  $c^*$  fixés, une augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  lorsque  $\lambda_2^0 d_2$  diminue.

Enfin, les variations de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (encart de la Fig 4.2C) montrent que la fréquence de relaxation  $\omega/2\pi$  est indépendante de la perméabilité hydrodynamique de la particule puisque celle-ci reste égale à  $5.10^3 \text{s}^{-1}$  quel que soit  $\lambda_2^0 d_2$ .

#### 4.2.1.2. Mobilité dynamique.

Les variations de mobilité dynamique correspondantes aux réponses diélectriques analysées dans le paragraphe précédent sont représentées dans la Figure 4.4. Ici, nous avons représenté uniquement les variations de la mobilité dynamique réelle sous sa forme réduite, dénotée  $\bar{\mu}'(\omega)$  donnée par :

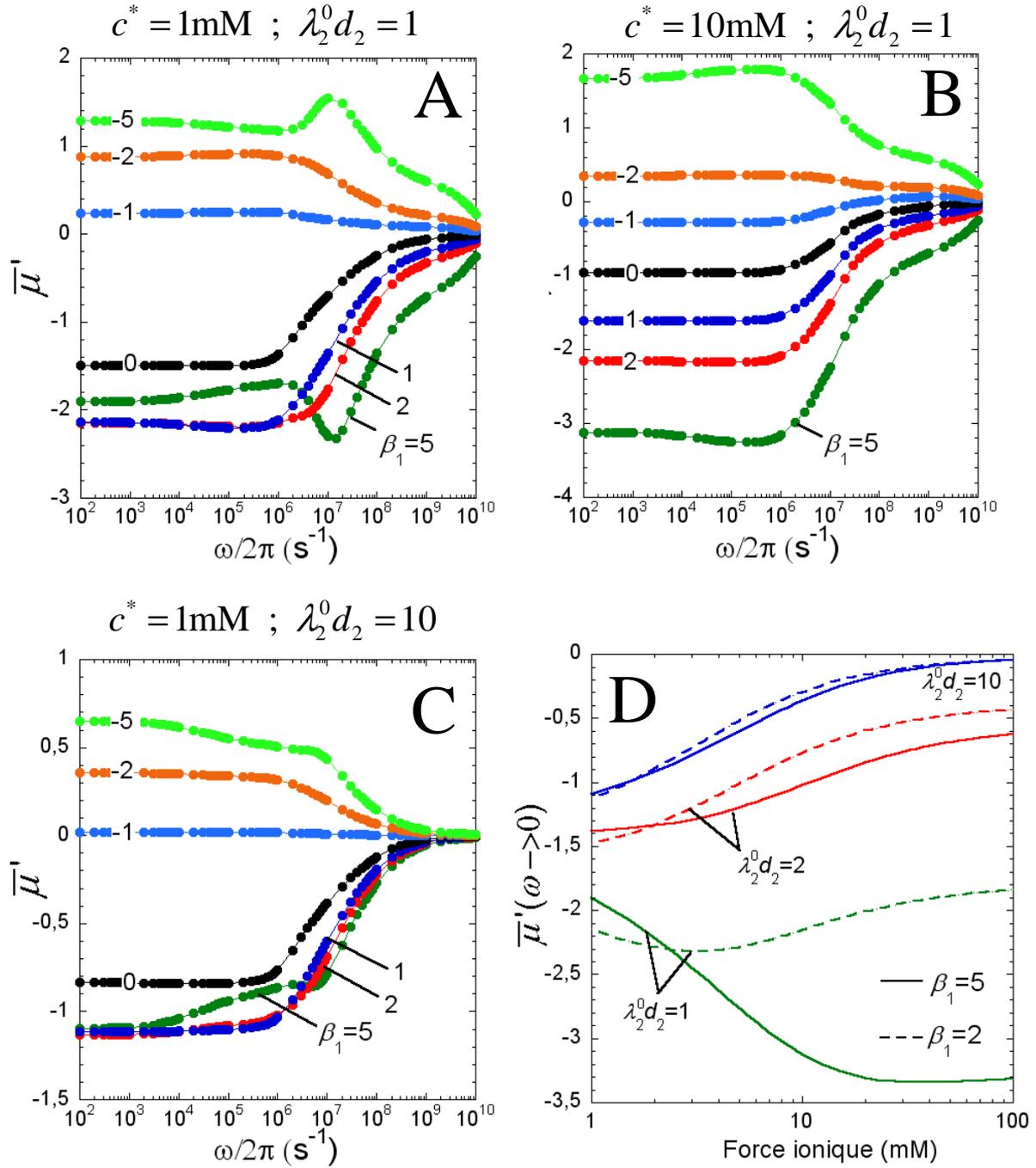
$$\bar{\mu}'(\omega) = \mu'_e(\omega) \frac{e\eta}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}. \quad (4.70)$$

Pour rappel, la mobilité  $\mu'_e(\omega \rightarrow 0)$  est égale à la mobilité électrophorétique  $\mu_e$  déterminée dans des conditions statiques, c'est-à-dire sous l'application d'un champ DC.

La Figure 4.4A représente les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  pour des suspensions diluées de particules molles de type cœur/couronne dont l'enveloppe perméable est composée de deux couches homogènes ( $\alpha_{i=1,2} \rightarrow 0$ ) de caractéristiques différentes. Les particules, caractérisée par une mollesse hydrodynamique  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ , sont dispersées dans une solution de concentration  $c^* = 1\text{mM}$ . La charge de la couche 2 est fixée à  $\rho_2^0/F = -10\text{ mM}$  et la charge de la couche 1 est variée à l'aide du paramètre  $\beta_1$ .

Considérons la situation où  $\beta_1 = 5$  (courbe verte foncée). Les deux couches perméables portent une charge négative. La mobilité dynamique est donc négative sur toute la gamme de fréquences sondées. Les variations de cette courbe sont similaires à la courbe typique commentée dans le Chapitre 1 §1.3.2.1. Pour rappel, à basses fréquences ( $\omega/2\pi < 10^3\text{ s}^{-1}$ ),  $\bar{\mu}'(\omega)$  est constante sous la variation de  $\omega/2\pi$  et sa magnitude est égale à la mobilité électrophorétique sans dimension obtenue sous l'application d'un champ électrique DC. Dans ce régime, la DCE est complètement relaxée. Une diminution de  $\omega/2\pi$  engendre une légère diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  entre  $10^3$  et  $10^6\text{ s}^{-1}$ , signature de la relaxation  $\alpha$ , suivie d'une augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  entre  $10^6$  et  $10^7\text{ s}^{-1}$ , signature de la relaxation MW. La courbe atteint un maximum à  $\omega/2\pi = 10^7\text{ s}^{-1}$  avant de décroître rapidement jusqu'à atteindre une valeur nulle.

Pour  $\beta_1 = -5$  (courbe verte claire), la couche 1 est chargée positivement contrairement à la couche 2 qui est chargée négativement. La figure montre que  $\bar{\mu}'(\omega)$  est positive sur toute la gamme de fréquence sondée. La particule se comporte donc comme une particule chargée positivement. Analysons ce phénomène. Lorsque  $c^* = 1\text{mM}$ , les gradients de potentiels électrostatiques à travers l'interphase sont importants (avec  $\kappa d_2 < 1$ ). Par conséquent, les variations de potentiels sondées par le flux électroosmotique dépendent des propriétés physico-chimiques de la couche interne chargée positivement d'où l'apparition d'une mobilité positive.



**Figure 4.4.** (A-C) Variations en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  de la mobilité dynamique réelle adimensionnée  $\bar{\mu}(\omega)$  dans une suspension de particules enveloppées de deux couches molles pour différents rapports  $\beta_1$  (indiqué) avec (A)  $c^* = 1\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ ; (B)  $c^* = 10\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  et (C)  $c^* = 1\text{mM}$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 10$ . (D) Variations de  $\bar{\mu}(\omega \rightarrow 0)$  en fonction de la force ionique pour différents rapports  $\beta_1$  et degrés de perméabilité  $\lambda_2^0 d_2$  (indiqué). Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\rho_2^0 / F = 10\text{mM}$ ;  $d_1 = 20\text{nm}$ ;  $d_2 = 5\text{nm}$ ;  $a = 300\text{nm}$ ;  $\phi = 0,01$ ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$ ;  $z = 1$ ;  $\beta_1^H = |\beta_1|$ .

Lorsque le flux électroosmotique pénètre dans la structure molle de la particule, celui-ci sonde (i) les variations de potentiel électrostatique dans la couche 2 et (ii) les forces de friction exercées par les segments polymères, où (i) et (ii) dépendent tous deux du paramètre  $\beta_1$  (avec  $\beta_1^H = |\beta_1|$ ). Premièrement, lorsque  $\beta_1$  augmente de -5 à -1, la magnitude des variations de potentiel à l'équilibre dans la zone sondée par les flux électroosmotiques (ici la couche 2) diminue (voir les profils de  $y^e(x)$  correspondants dans la Figure 4.3A).  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  doit donc diminuer ce qui est en effet observé. Deuxièmement, la diminution de  $|\beta_1| = \beta_1^H$  est supposée diminuer les forces de friction exercées par les segments polymères et, par conséquent, accélérer la particule (augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$ ). D'après la Figure 4.4A, la contribution électrostatique domine la contribution hydrodynamique avec une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  lorsque la charge de la couche 1 diminue ( $|\beta_1|$  diminue).

Une augmentation supplémentaire de  $\beta_1$ , depuis  $\beta_1 = 0$  jusqu'à  $\beta_1 = 5$ , entraîne un changement de signe de  $\bar{\mu}'(\omega)$  qui est dans ce cas négative. Ceci est la conséquence des potentiels électrostatiques négatifs sondés par le flux électroosmotique puisque la charge de la couche 1 est soit nulle ( $\beta_1 = 0$ ), soit du même signe que la charge de la couche 2 ( $\beta_1 > 0$ ). Analysons les variations de la magnitude de  $\bar{\mu}'(\omega)$  à  $\omega$  fixé en fonction de  $\beta_1$ . Comme attendu, l'augmentation de  $\beta_1$  de 0 à 1 entraîne une augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  quel que soit  $\omega$ . Cependant, la comparaison des résultats obtenus pour  $\beta_1 = 1, 2$  et 5 nous montre que pour (i)  $\omega/2\pi > 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $|\bar{\mu}'(\beta_1=5)|$  est supérieur à  $|\bar{\mu}'(\beta_1=1;2)|$  et pour (ii)  $\omega/2\pi < 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $|\bar{\mu}'(\beta_1=5)|$  est inférieur à  $|\bar{\mu}'(\beta_1=1;2)|$ . Dans le régime (i), la fréquence d'oscillation du champ ne permet pas la diffusion/migration des ions dans la DCE et le nuage ionique autour de la particule n'est pas polarisé et ne crée pas de champ de polarisation opposé au champ appliqué. Par conséquent,  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  augmente lorsque la charge de la couche 1 augmente ( $\beta_1$  augmente). Dans le régime (ii), la fréquence d'oscillation du champ autorise le déplacement des ions dans la DCE. Pour  $\beta_1 = 2$  et surtout pour  $\beta_1 = 5$ , les potentiels électrostatiques dans l'interphase sont élevés et entraînent une forte polarisation de la particule qui crée un champ de polarisation induit. Pour rappel, ce champ de polarisation induit contre les effets du champ appliqué, c'est pourquoi  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  est quasiment constante lorsque  $\beta_1$  augmente de 1 à 2 puis

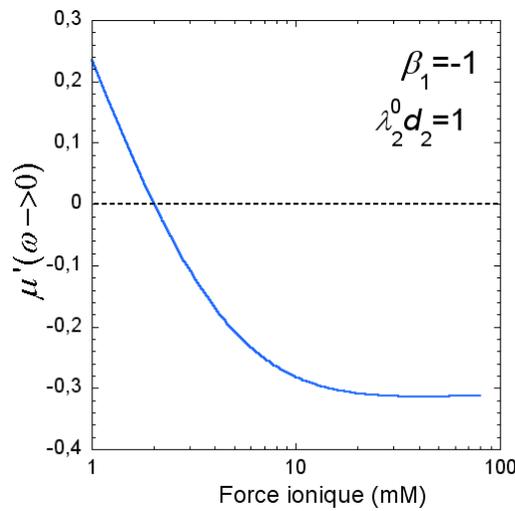
diminue quand  $\beta_1$  augmente de 2 à 5. Ce même phénomène est à l'origine de la diminution de la permittivité lorsque que la charge de la couche 1 augmente (voir le §4.2.1.1).

Pour finir, la forme des courbes obtenues pour  $\beta_1 = -5$  et  $5$  sont fortement impactées par les relaxations  $\alpha$  et MW (notamment avec l'apparition d'un pic). A l'inverse, les autres cas présentés ici ( $\beta_1 = -2$  jusqu'à  $2$ ) manifestent une seule décroissance de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  lorsque  $\omega/2\pi$  se rapproche de  $\omega_i/2\pi$ . Les potentiels électrostatiques l'équilibre à travers l'interphase et la charge des couches molles ne sont pas suffisamment élevées pour que le déplacement des ions au voisinage/au sein de la particule provoque des variations importantes de mobilité.

La comparaison entre les Figures 4.4A et 4.4B permet d'étudier l'impact de la force ionique du milieu sur la mobilité dynamique. Les spectres de mobilité ont été obtenus dans les mêmes conditions à l'exception de la force ionique avec  $c^* = 1$  mM (Fig. 4.4A) et  $c^* = 10$  mM (Fig. 4.4B).

Commençons par la comparaison des courbes labellisées  $\beta_1 = -5$  et  $\beta_1 = 5$ . Pour ces deux cas, nous observons une augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  quand  $c^*$  augmente à l'image des résultats de réponse diélectrique correspondants. L'explication est identique. L'augmentation de  $c^*$  conduit à une diminution des magnitudes des potentiels électrostatiques à l'équilibre à travers l'interphase ce qui affaiblit le champ de polarisation et accélère la particule ( $|\bar{\mu}'(\omega)|$  augmente). Les variations de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  pour  $\beta_1 = -2$  à  $\beta_1 = 2$  sont plus attendues avec une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  quand  $c^*$  augmente, c'est-à-dire quand la magnitude de  $y^e(x)$  dans l'interphase diminue. Ces résultats sont illustrées dans la Figure 4.4D qui représente les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  pour  $\omega \rightarrow 0$  en fonction de  $c^*$  pour différents paramètres  $\beta_1$  ( $\beta_1 = 2$  et  $5$ ) et différentes perméabilités hydrodynamiques ( $\lambda_2^0 d_2 = 1, 2$  et  $10$ ). Pour  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  (courbes vertes) et  $c^* < 2$  mM, la figure montre que  $|\bar{\mu}'(\beta_1 = 5)|$  est inférieur à  $|\bar{\mu}'(\beta_1 = 2)|$  pour les raisons citées plus haut. Lorsque  $c^*$  est supérieur à  $2$  mM, la tendance est inversée avec  $|\bar{\mu}'(\beta_1 = 5)| > |\bar{\mu}'(\beta_1 = 2)|$  puisque l'écrantage des charges fixes par les ions mobiles est suffisant pour diminuer les effets du champ de polarisation ( $|\bar{\mu}'(\beta_1 = 5)|$  augmente et  $|\bar{\mu}'(\beta_1 = 2)|$  diminue lorsque  $c^*$  augmente).

Maintenant, intéressons-nous à la situation où  $\beta_1 = -1$  où les couches 1 et 2 ont une densité de charge de même magnitude mais de signe opposé. Pour de faibles forces ioniques ( $c^* = 1$  mM, fig. 4.4A),  $\bar{\mu}'(\omega)$  est positive sur toute la gamme de fréquences avec  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0) = 0,23$ . A l'inverse pour  $c^* = 10$  mM (fig. 4.4B),  $\bar{\mu}'(\omega)$  est négative avec  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0) = -0,28$ . Ce résultat est illustré dans la Figure 4.5 qui représente les variations de  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$  en fonction de  $c^*$ . Examinons plus en détail ce changement de signe.



**Figure 4.5.** Variations de  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$  de particules entourées de deux couches molles en fonction de la force ionique avec  $\beta_1 = -1$  et  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ . Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\rho_2^0 / F = -10$  mM ;  $d_1 = 20$  nm ;  $d_2 = 5$  nm ;  $a = 300$  nm ;  $\phi = 0,01$  ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$  ;  $z = 1$  ;  $\beta_1^H = |\beta_1|$ .

Premièrement considérons la situation où  $c^* < 2$  mM,  $\bar{\mu}'(\omega)$  est positive *i.e.* du même signe que la charge de la couche 1. Dans ce cas, les gradients de potentiels électrostatiques à l'équilibre dans l'interphase sont importants et le flux électroosmotique qui se développe dans l'intégralité de la couche 2 sonde les propriétés électrostatiques de la couche 1 chargée positivement (avec  $\kappa d_2 \leq 1$ ). Sous l'augmentation de  $c^*$ , l'étendue de la DCE dans la structure molle diminue et les gradients de potentiels diminuent également. Ceci implique que les propriétés électrostatiques de la couche 1 impactent de moins en moins la mobilité de la particule quand  $c^*$  augmente. C'est pourquoi  $\bar{\mu}'(\omega)$  diminue et atteint une valeur négative pour  $c^* > 2$  mM ( $\kappa d_2 > 1$ ). Notons que  $\bar{\mu}'(\omega)$  tend vers une valeur non nulle quand  $c^* \rightarrow \infty$

en raison de la présence d'une enveloppe polymérique chargée à la surface de la particule rigide [15-16].

La comparaison entre les Figures 4.2A et 4.2C permet d'étudier les effets de la mollesse hydrodynamique des particules molles sur les variations de leur mobilité dynamique. Les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de  $\omega$  ont été obtenues dans les mêmes conditions à l'exception du paramètre  $\lambda_2^0 d_2$  qui augmente de  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  (Fig. 4.2A) à  $\lambda_2^0 d_2 = 10$  (Fig. 4.2C).

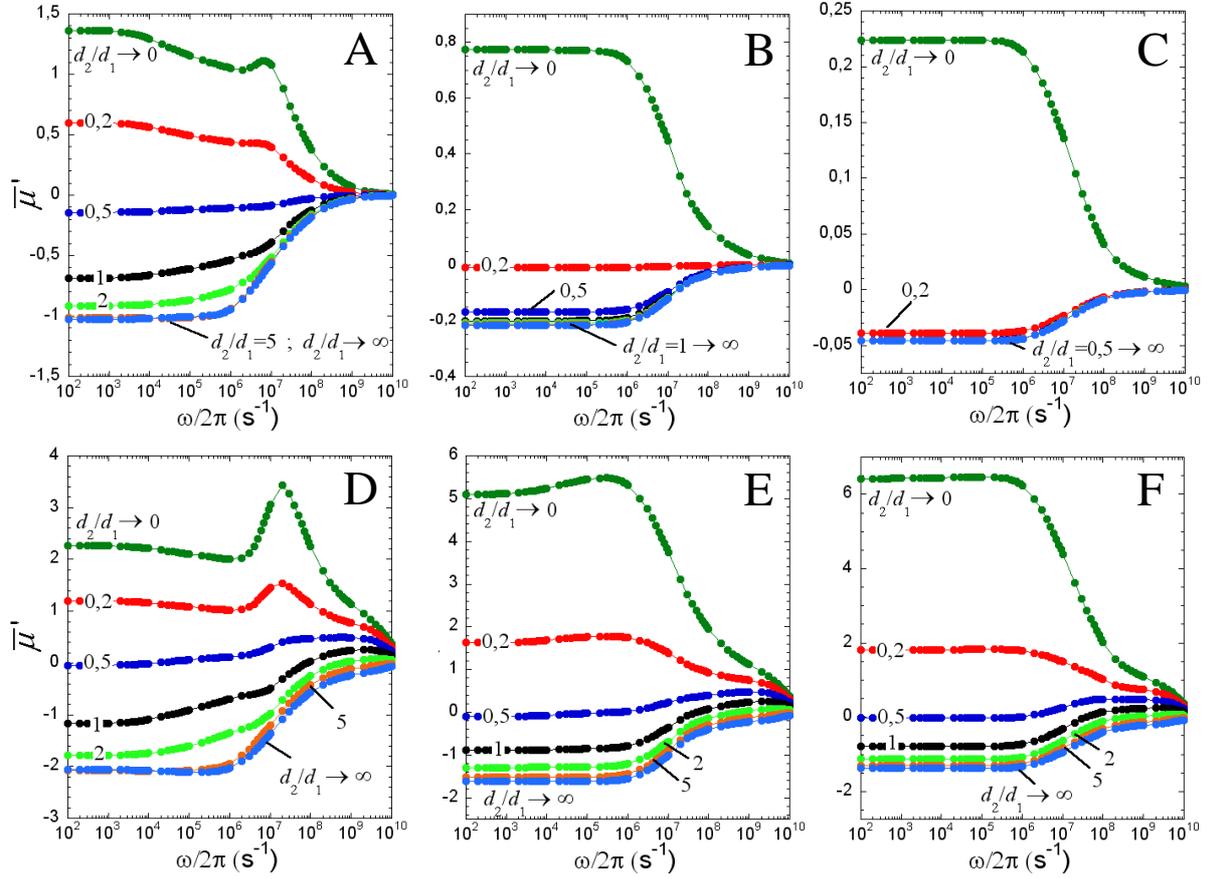
Pour  $\lambda_2^0 d_2 = 10$ , la zone sondée par le flux électroosmotique est caractérisée par des potentiels à l'équilibre  $y^e(x)$  compris entre -2 et 1 pour des paramètres  $\beta_1$  variant de -5 à 5 (voir la Figure 4.3A). Lorsque  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ , le flux électroosmotique pénètre plus en profondeur dans la structure perméable et sonde des potentiels  $y^e(x)$  qui varient entre -4 et 3 en fonction de  $\beta_1$ . Pour un  $\beta_1$  fixé, les distributions de  $y^e(x)$  sondées par le flux augmentent en magnitude lorsque la perméabilité hydrodynamique de l'enveloppe molle de la particule augmente ( $\lambda_2^0 d_2$  diminue). Par conséquent,  $\bar{\mu}'(\omega)$  doit augmenter quand  $\lambda_2^0 d_2$  diminue. Nous observons bien ce résultat en comparant les Figures 4.4A et 4.4C.

La Figure 4.4D donne des informations supplémentaires sur les effets de  $\lambda_2^0 d_2$  sur  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$ . Pour  $\lambda_2^0 d_2 \gg 1$ , la pénétration du flux dans la structure molle de la particule est trop faible pour que  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$  dépendent des propriétés électrostatiques de la couche 1 et  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$  est quasiment indépendant de  $\beta_1$  sur la gamme de forces ioniques analysée. Plus la particule sera perméable (*i.e.* plus  $\lambda_2^0 d_2$  sera faible), plus les propriétés électrostatiques de la couche 1 impacteront  $\bar{\mu}'(\omega \rightarrow 0)$ .

#### **4.2.2. Impact de l'épaisseur des couches molles entourant une particule sur sa mobilité dynamique.**

Les variations de la mobilité dynamique  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  dans des suspensions diluées de particules constituées d'un cœur dur entouré de deux couches molles, dont leur épaisseur respective est variée, sont représentées dans la Figure 4.6. Pour se faire, l'épaisseur de l'enveloppe polymérique totale est fixée à  $d_1+d_2 = 30$  nm et  $\bar{\mu}'(\omega)$  est

évaluée pour différents rapports  $d_2/d_1$ . La densité de charge de la couche 2 est fixée à  $\rho_2^0 / F = -10\text{mM}$  et la couche interne 1 porte une charge de signe opposée avec  $\beta_1 = -5$ .

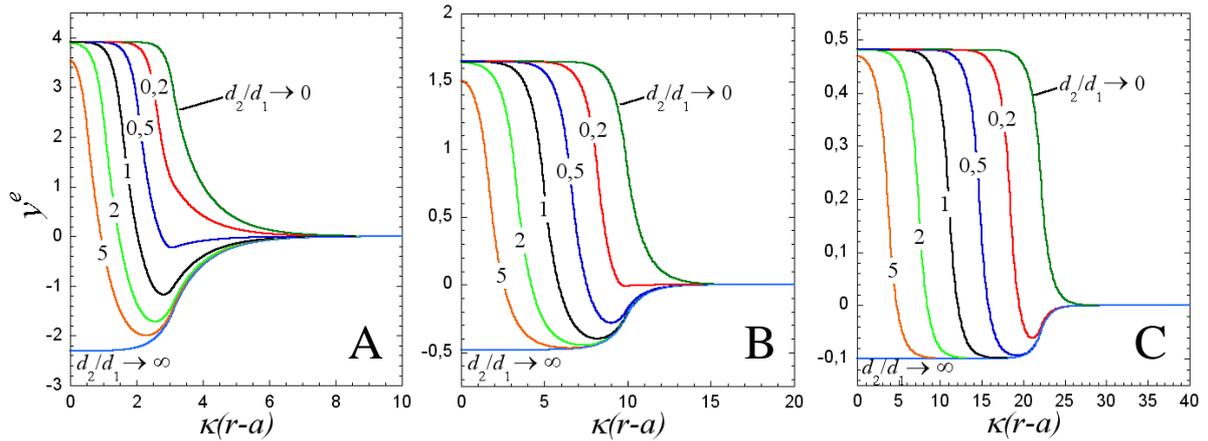


**Figure 4.6.** Variations en fonction de  $\omega/2\pi$  de la mobilité dynamique réelle adimensionnalisée  $\bar{\mu}'(\omega)$  de particules enveloppées de deux couches molles. Les particules sont suspendues dans une solution de concentration en électrolyte (A ; D)  $c^* = 1\text{mM}$ , (B ; E)  $c^* = 10\text{mM}$  et (C ; F)  $c^* = 50\text{mM}$  pour différents rapports  $d_2 / d_1$  (indiqué) avec (A-C)  $1/\lambda_2^0 = 0,1\text{nm}$  et (D-F)  $1/\lambda_2^0 = 5\text{nm}$ . Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\beta_1 = -5$  ;  $\rho_2^0 / F = -10\text{mM}$  ;  $\phi = 0,01$  ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$  ;  $z = 1$  ;  $\beta_1^{\text{H}} = |\beta_1|$  ;  $d_2 + d_1 = 30\text{nm}$ .

Les Figures 4.6A-C représentent les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  pour des particules caractérisées par une faible mollesse hydrodynamique  $1/\lambda_2^0 = 0,1\text{nm}$  et suspendues dans une solution électrolyte de concentration  $c^* = 1\text{mM}$  (panel A),  $c^* = 10\text{mM}$  (panel B) et  $c^* = 50\text{mM}$  (panel C). La distribution des potentiels locaux à l'équilibre  $y^c(x)$  correspondants sont représentés dans la Figure 4.7. A faible force ionique ( $c^* = 1\text{mM}$  - panel A) et pour  $d_2/d_1 \rightarrow \infty$ ,  $\bar{\mu}'(\omega)$  est uniquement contrôlée par les propriétés électrostatiques de la couche 2 chargée négativement.

$\bar{\mu}'(\omega)$  est donc négative. Pour l'autre cas extrême où  $d_2/d_1 \rightarrow 0$ ,  $\bar{\mu}'(\omega)$  est positive et est déterminée exclusivement par les propriétés électrostatiques de la couche 1. En augmentant le rapport  $d_2/d_1$  de 0 à 5,  $\bar{\mu}'(\omega)$  diminue et reste positif ( $d_2/d_1=0$  à 0,2), puis  $\bar{\mu}'(\omega)$  change de signe et augmente en valeur absolue ( $d_2/d_1 = 0,5$  à 2). En effet, pour  $d_2/d_1 = 0$  à 0,2 le flux électroosmotique sonde principalement les propriétés électrostatiques de la couche 1 avec  $\kappa d_2 < 1$ . Pour  $d_2/d_1 = 0,5$  à 2, la DCE s'étend seulement au sein de la couche 2 ( $\kappa d_2 \geq 1$ ) de telle sorte que  $\bar{\mu}'(\omega)$  dépende de moins en moins des caractéristiques de la couche 1 sous l'augmentation de  $d_2/d_1$ . Une augmentation supplémentaire de  $d_2/d_1$  (de  $d_2/d_1 = 5$  à  $d_2/d_1 \rightarrow \infty$ ) n'a pas d'effet sur les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$ . Dans cette situation, l'égalité  $\kappa d_2 \gg 1$  est vérifiée signe que les propriétés électrostatiques de la couche 1 n'impactent pas  $\bar{\mu}'(\omega)$ .

Comparons les panels A à C. Si  $c^*$  augmente, Les gradients de potentiel électrostatique à travers l'interphase diminuent (voir Figure 4.7). La densité de charge portée par la couche 1 impactent de moins en moins les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$ . A l'exception du cas spécifique où la particule porte exclusivement des charges positives ( $d_2/d_1 \rightarrow \infty$ ), les spectres de mobilité dynamique obtenus pour chaque rapport  $d_2/d_1$  se resserrent et sont même confondus pour  $c^*=50\text{mM}$  où  $\kappa d_2 \gg 1$  quel que soit  $d_2/d_1$ .



**Figure 4.7.** Profils de potentiels électrostatiques  $y^e(x)$  à l'équilibre depuis la surface dure de la particule vers le milieu externe de particules bicouche immergées dans un électrolyte de concentration  $c^*$  à 1mM (panel A), 10mM (panel B) et 50mM (panel C) pour différents rapports  $d_2/d_1$  (indiqué). Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $\beta_1 = -5$ ;  $\rho_2^0/F = -10\text{mM}$ ;  $\phi = 0,01$ ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$ ;  $z = 1$ ;  $\beta_1^H = |\beta_1|$ ;  $d_2 + d_1 = 30\text{nm}$ .

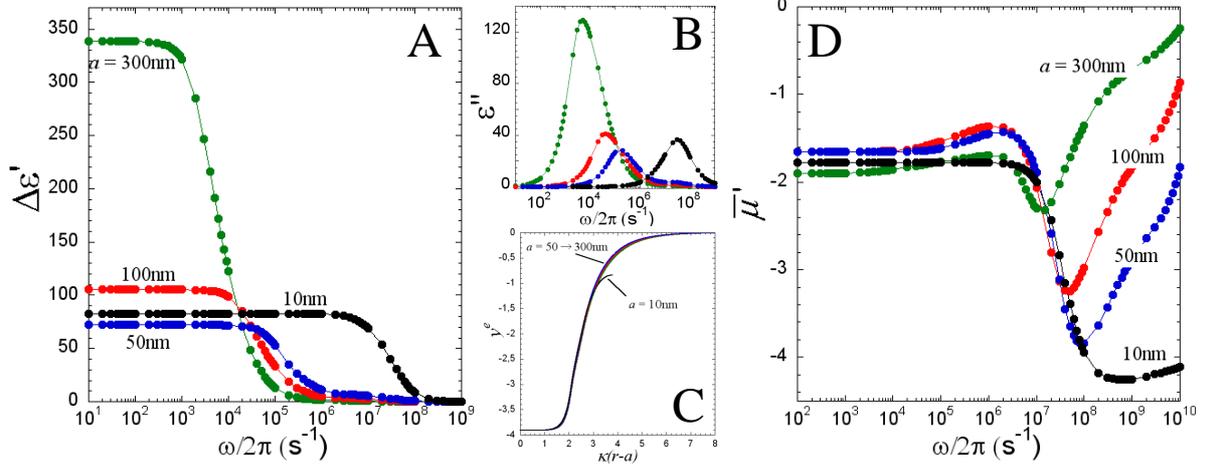
Les Figures 4.6D-F représentent les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  pour des particules caractérisées par une perméabilité hydrodynamique  $1/\lambda_2^0 = 5\text{nm}$  et suspendues dans une solution électrolyte de concentration  $c^* = 1\text{ mM}$  (panel D),  $c^* = 10\text{ mM}$  (panel E) et  $c^* = 50\text{ mM}$  (panel F). Les variations de la mobilité  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de  $d_2/d_1$  sont similaires aux résultats obtenus dans le cas où la structure molle autour des particules est peu perméable ( $1/\lambda_2^0 = 0,1\text{nm}$  – Fig. 4.6A-C). La seule différence notable est illustrée dans les panels E et F. En particulier pour  $c^* = 50\text{ mM}$  (panel F), même si la condition  $\kappa d_2 \gg 1$  est satisfaite,  $\bar{\mu}'(\omega)$  dépend des caractéristiques de la couche 1 pour les rapports  $d_2/d_1 = 0,2$  à 1 de telle sorte que l’ensemble des courbes ne sont pas confondues avec la situation  $d_2/d_1 \rightarrow \infty$ . Ceci est dû à une pénétration plus en profondeur des flux électroosmotiques au sein de l’enveloppe polymérique ( $1/\lambda_2^0 = 5\text{nm}$ ) par rapport au cas précédent ( $1/\lambda_2^0 = 0,1\text{nm}$ ). L’impact des propriétés de la distribution de segments polymères dans la couche 1 sur les variations de la mobilité dynamique est donc plus déterminant.

Les spectres diélectriques correspondants ne sont pas présentés ici car les variations de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  obéissent à la même loi que dans la section précédente avec une augmentation de la magnitude de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  avec la charge totale. Nous avons également vérifié que  $\omega_\alpha$  est à la fois indépendant de  $d_2/d_1$  et de  $d_1 + d_2$  et ce même lorsque la particule est imperméable (avec  $1/\lambda_2^0 \rightarrow 0$ ) et lorsque l’épaisseur totale de l’enveloppe polymérique est proche du rayon du cœur dur de la particule.

### 4.2.3. Impact du rayon du cœur dur de la particule.

La Figure 4.8A-B représente les variations de l’incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  (Fig. 4.8A) et de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (Fig. 4.8B) en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  dans des suspensions de particules entourées de deux couches molles pour différents rayon du cœur dur de la particule ( $a$ ) sous la condition  $a + d_1 + d_2 + \kappa^{-1} < b$  afin d’éviter le recouvrement des segments polymériques et des DCEs de deux particules voisines. La fraction volumique de particule dans la solution est fixée à  $\phi = a^3/b^3 = 0,01$  de telle sorte qu’une diminution de  $a$

implique une diminution du rayon de la cellule modèle  $b$  et par conséquent un rapprochement des particules suspendues.

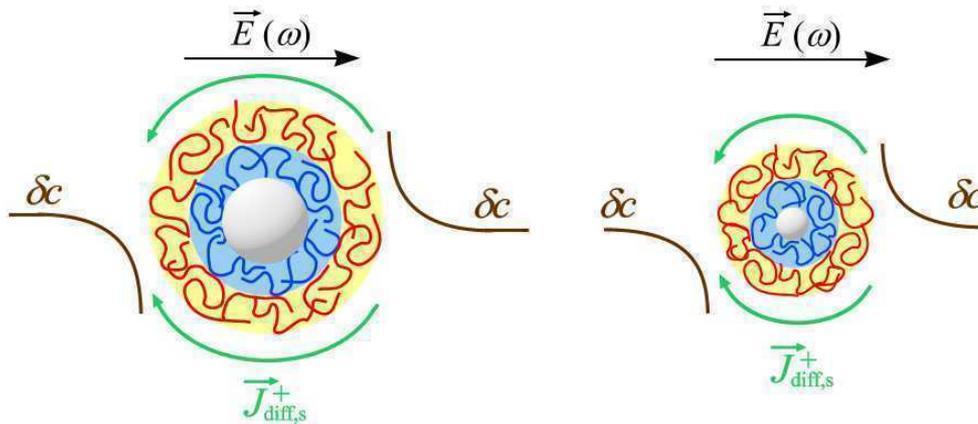


**Figure 4.8.** Variations en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  de l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  (panel A), de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (panel B) et de la mobilité dynamique réelle adimensionnalisée  $\bar{\mu}'(\omega)$  (panel D) dans une suspension de particules enveloppées de deux couches molles pour différents rayons de cœur dur  $a$  (indiqué). Panel C : Profils de potentiels électrostatiques  $y^e(x)$  à l'équilibre correspondants depuis la surface dure de la particule vers la solution d'électrolyte. Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $c^* = 1\text{mM}$  ;  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  ;  $\beta_1 = \beta_1^H = 5$  ;  $\rho_2^0 / F = -10\text{mM}$  ;  $d_1 = 20\text{nm}$  ;  $d_2 = 5\text{nm}$  ;  $\phi = 0,01$  ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$  ;  $z = 1$ .

A basse fréquence,  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  diminue lorsque  $a$  diminue de 300 nm à 50 nm. Ceci est la conséquence directe de la diminution du volume des couches perméables  $V_1$  et  $V_2$  (voir la Figure 4.9 pour illustration). La magnitude de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  étant déterminée par la charge totale  $Q_{\text{tot}}$  (définie par  $Q_{\text{tot}} = V_1\beta_1\rho_2^0 + V_2\rho_2^0$ ) portée par la structure molle de la particule, une diminution de  $V_1$  et  $V_2$  conduit à une chute de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$ . La figure montre une légère augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  lorsque  $a$  varie de 50 nm à 10 nm. Cette augmentation peut être expliquée en examinant les distributions de potentiel électrostatiques à l'équilibre  $y^e(x)$  à travers l'interphase représentées dans la Figure 4.8C. Pour  $a = 50$  à 300 nm, les profils de  $y^e(x)$  sont quasiment identiques (les propriétés électrostatiques et de l'épaisseur de l'interphase sont inchangées sous la variation de  $a$  et la condition  $a + d_1 + d_2 + \kappa^{-1} \ll b$  est vérifiée). Pour  $a = 10$  nm, la distribution de  $y^e(x)$  montre une légère augmentation du potentiel local dans l'interphase. Malgré le respect de la condition  $a + d_1 + d_2 + \kappa^{-1} < b$ , deux particules voisines

entrent en interaction électrostatique avec un recouvrement de leurs DCEs extra-particulaires respectives ce qui entraîne une augmentation du potentiel local dans la zone de recouvrement. Cette augmentation de potentiel électrostatique local donne lieu à l’augmentation de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  observée.

En accord avec l’équation (4.67), la fréquence caractéristique de la relaxation  $\alpha (\omega_\alpha)$  augmente vers de plus hautes fréquences lorsque le rayon du cœur dur de la particule diminue (voir le déplacement du maximum dans les variations de  $\epsilon''(\omega)$  vers la droite). Pour  $a = 50$  à 300 nm,  $\omega_\alpha$  est inversement proportionnelle à  $a^2$ . Pour comprendre ce résultat, nous avons schématisé dans la Figure 4.9 deux particules pour différents rayons  $a$  lors de l’établissement d’un gradient de concentration autour des particules suite à l’application du champ électrique.



**Figure 4.9.** Illustration de la polarisation de concentration  $\delta c$  et des flux de diffusion résultants autour de la particule, pour deux rayons de cœur dur de la particule  $a$

Typiquement, le schéma de gauche représente la situation où  $a = 300$  nm et le schéma de droite correspond au cas où  $a = 50$  nm. La relaxation  $\alpha$  est caractérisée par la diffusion de contre-ions autour d’une particule (ici du côté droit vers le côté gauche) résultant du gradient de concentration (flèche verte dans le schéma). Si le rayon du cœur dur de la particule diminue, la distance que ces contre-ions doivent parcourir pour se déplacer d’un côté à l’autre de la particule diminue également (voir Fig. 4.9). Par conséquent le temps associé à ce parcours diminue et la fréquence correspondante ( $\omega_\alpha$ ) augmente.

Pour  $a = 50$  et  $100\text{nm}$ , les variations de  $\varepsilon''(\omega)$  en fonction de  $\omega/2\pi$  manifestent un léger épaulement à  $\omega/2\pi = 3.10^7\text{s}^{-1}$ , signature de la relaxation MW. Comme attendue,  $\omega_{\text{MW}}$  ne dépend pas de la taille de la particule et reste constant quel que soit  $a$ .

La Figure 4.8D représente les variations de la mobilité réelle sans dimension  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  obtenues dans les mêmes conditions que pour l'étude de la réponse diélectrique.

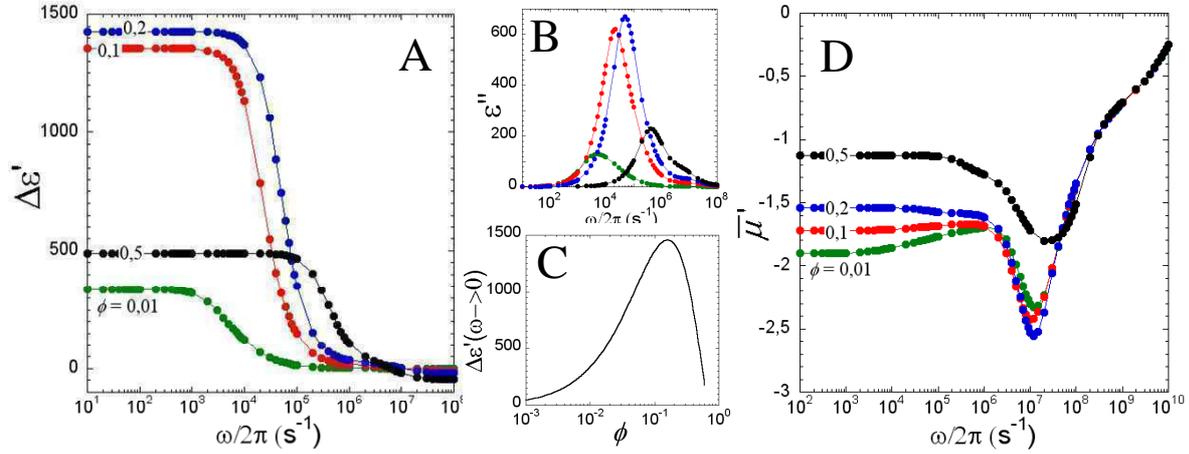
Pour  $\omega \rightarrow 0$ , le rayon  $a$  impacte peu les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$ . Contrairement à  $\Delta\varepsilon'(\omega)$ ,  $\bar{\mu}'(\omega)$  ne dépend pas directement de  $Q_{\text{tot}}$ . A la place  $\bar{\mu}'(\omega)$  est liée à la distribution de  $y^c(x)$  dans la zone de l'interphase dans laquelle le flux électroosmotique pénètre (ici  $\lambda_2^0 d_2 = 1$ ).

Pour  $\omega/2\pi > 10^7\text{s}^{-1}$  (i.e.  $\omega/2\pi$  supérieur à  $\omega_{\text{MW}}/2\pi$  environ), une diminution de  $a$  entraîne une augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$ . En effet, lorsque  $\omega$  est supérieur à  $\omega_{\text{MW}}$  et se rapproche de  $\omega$ , la particule décélère et atteint une valeur nulle quand  $\omega$  est trop grand pour permettre à la particule de se déplacer. Pour  $a = 300\text{ nm}$ , la décélération de la particule intervient à des fréquences proches de  $\omega/2\pi \approx 10^7\text{s}^{-1}$ , la décélération débute ensuite à  $\omega/2\pi \approx 5.10^7\text{s}^{-1}$  pour  $a = 100\text{ nm}$  et à  $\omega/2\pi \approx 10^8\text{s}^{-1}$  pour  $a = 50\text{ nm}$ . Ce résultat est en accord avec la relation (4.69) qui montre que la fréquence  $\omega_1$  augmente lorsque  $a$  diminue. Dans la situation où  $a = 10\text{ nm}$ , la diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  dans le régime hautes fréquences (ici pour  $\omega/2\pi > 4.10^8\text{s}^{-1}$ ) est faible dans la gamme de fréquence sondée (jusqu'à  $10^{10}\text{s}^{-1}$ ). Ici, la fréquence de relaxation  $\omega_1$  intervient à des fréquences supérieures à  $10^{10}\text{s}^{-1}$ .

La dernière information donnée par la Figure 4.8D concerne l'impact de la relaxation  $\alpha$  sur les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$ . Pour  $a = 50$  à  $300\text{ nm}$ , nous observons une légère diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  entre  $4.10^3$  et  $10^6\text{ s}^{-1}$  due à la relaxation  $\alpha$ . Cette diminution est décalée vers les hautes fréquences lorsque  $a$  augmente en accord avec les résultats de réponse diélectrique. Pour  $a = 10\text{ nm}$ , la relaxation  $\alpha$  n'impacte pas les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  car, d'après les résultats de réponse diélectrique,  $\omega_\alpha$  est confondue avec  $\omega_{\text{MW}}$  avec  $\omega_\alpha \approx \omega_{\text{MW}} \approx 3.10^7\text{ s}^{-1}$ .

#### 4.2.4. Impact de la concentration en particules dans la suspension.

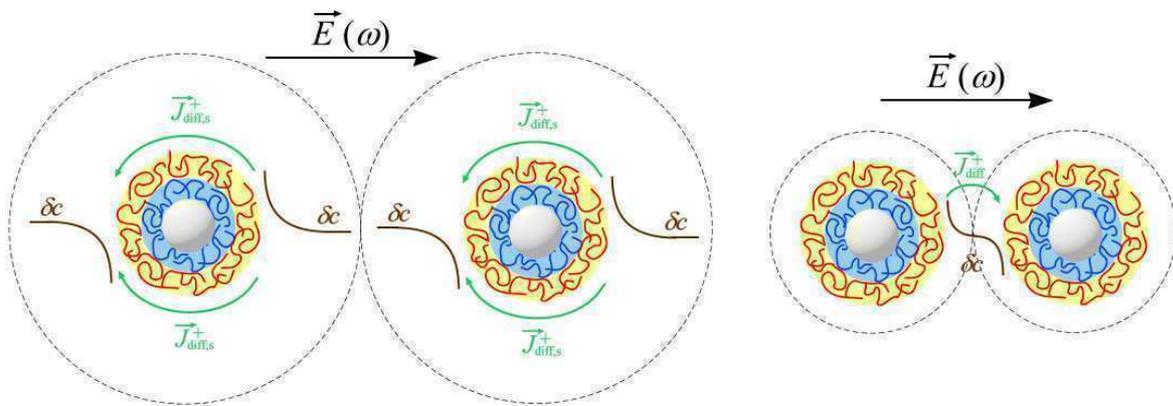
La Figure 4.10A-B représente les variations de l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  (Fig. 4.10A) et de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (Fig. 4.10B) en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  dans des suspensions de particules entourées de deux couches molles pour différentes fractions volumiques en particules  $\phi$  sous la condition  $a + d_1 + d_2 + \kappa^{-1} < b$  pour éviter le recouvrement des segments polymériques et des DCE de deux particules voisines. Le rayon du cœur dur des particules  $a$  est fixé de telle sorte qu'une augmentation de  $\phi$  entraîne une augmentation de la concentration en particules dans la solution et le rapprochement des particules suspendues dans la solution.



**Figure 4.10.** Variations en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  de l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'(\omega)$  (panel A), de la perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  (panel B) et de la mobilité dynamique réelle adimensionnalisée  $\bar{\mu}(\omega)$  (panel C) dans une suspension de particules enveloppées de deux couches molles pour différentes fractions volumiques  $\phi$  (indiqué). (C) Variations de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  en fonction de la fraction volumique  $\phi$ . Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $c^* = 1\text{mM}$  ;  $\lambda_2^0 d_2 = 1$  ;  $\beta_1 = \beta_1^H = 5$  ;  $\rho_2^0 / F = -10\text{mM}$  ;  $d_1 = 20\text{nm}$  ;  $d_2 = 5\text{nm}$  ;  $a = 300\text{nm}$  ;  $\alpha_1 = \alpha_2 \rightarrow 0$  ;  $z = 1$ .

A basses fréquences,  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  augmente lorsque  $\phi$  augmente de 0,01 à 0,2 et  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  diminue quand  $\phi$  augmente de 0,2 à 0,5. Cette observation est détaillée dans la Figure 4.10C où la magnitude de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  est représentée en fonction de  $\phi$ . Une dispersion de particules très diluée ( $\phi \ll 1$ ) est caractérisée par une permittivité quasi-nulle car la suspension est composée essentiellement de liquide de permittivité  $\epsilon_r$ . L'impact de la polarisation de concentration autour des quelques particules présentes est donc masqué.

L'ajout de particule dans la solution entraîne une augmentation graduelle de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  jusqu'à atteindre une valeur critique pour  $\phi \approx 0,2$ . Cette augmentation provient de l'ajout de particules chargées dans la suspension qui va de pair avec une augmentation de la quantité de charges fixes dans la solution. Une augmentation supplémentaire de  $\phi$  entraîne une brusque chute de  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$ . Pour comprendre ce phénomène, considérons la Figure 4.11 où deux suspensions de particules sont représentées pour deux fractions volumiques différentes et pour des gammes de fréquences autorisant l'établissement de la polarisation  $\alpha$ .



**Figure 4.11.** Illustration de la polarisation de concentration  $\delta c$  et des flux de diffusion résultants, pour deux fractions volumiques  $\phi$  différentes

La figure de gauche illustre la polarisation de concentration pour des fractions volumiques  $\phi$  comprises entre 0,01 et 0,1. Dans ce cas, deux particules voisines et leurs zones d'accumulation/déplétion d'électrolyte neutre ( $\delta c$ ) sont nettement séparées. Lorsque les particules se rapprochent c'est-à-dire pour  $\phi > 0,2$ , ces zones se recouvrent (voir la figure de droite). L'amplitude de la polarisation de concentration diminue et la permittivité chute. L'examen des distributions de potentiels électrostatiques à l'équilibre  $y^e(x)$  (non montré ici) nous permettent d'affirmer qu'il n'y a pas recouvrement des DCEs extra-particulaires de deux particules voisines dans la gamme de fractions volumiques  $\phi$  examinée (*i.e.* de  $\phi = 0,001$  à 0,6).

D'après la Figure 4.10A,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  diminue et devient négatif lorsque  $\phi$  augmente dans le régime des hautes fréquences ( $\omega/2\pi > \omega_{MW}/2\pi \approx 3.10^7 \text{ s}^{-1}$ ). Pour en connaître la cause, référons-nous à l'équation (1.17) (Chapitre 1 §1.4.1.). l'équation indique que le moment dipolaire créé immédiatement après application d'un champ électrique, et donc avant que les

contre-ions ne migrent dans la DCE (relaxation MW), est déterminé par la différence de permittivité entre la particule dure ( $\varepsilon_p = 2$ ) et le milieu de suspension ( $\varepsilon_r = 78,4$ ). Pour des suspensions de particules diluées ( $\phi \approx 0,01$ ), la quantité de solide de permittivité  $\varepsilon_p$  est faible devant le volume de solution de permittivité  $\varepsilon_r$ . Par conséquent la permittivité complexe  $\varepsilon^*(\omega \rightarrow \infty)$  tend vers  $\varepsilon_r$  d’où  $\Delta\varepsilon'(\omega \rightarrow \infty) = \varepsilon^*(\omega \rightarrow \infty) - \varepsilon_r = 0$ . L’ajout de particules dans la solution impose une augmentation graduelle de la quantité de matière de permittivité  $\varepsilon_p < \varepsilon_r$  et donc une diminution de  $\Delta\varepsilon'(\omega \rightarrow \infty)$ .

L’examen des variations de  $\varepsilon''(\omega)$  en fonction de  $\omega$  (Figure 4.10B) montre une dépendance de  $\omega_\alpha$  vis-à-vis de  $\phi$ . L’ajout de particules dans la solution ( $\phi$  augmente) entraîne une augmentation de  $\omega_\alpha$ . Cette caractéristique n’est pas apportée par l’équation (4.67) mais peut être expliquée en examinant la Figure 4.11. Dans le cas de suspensions diluées représentées dans le dessin de gauche, l’établissement d’un gradient de concentration génère des flux de diffusion de contre-ions d’un côté à l’autre de la particule. Le temps de diffusion associé à ce déplacement est proportionnel à  $a^2 / D$ . Lorsque  $\phi$  augmente, la distance séparant deux particules voisines diminue et est inférieure à  $a$  (illustration de droite). Par conséquent, les contre-ions vont diffuser d’une particule à l’autre sur une distance plus faible. Le temps de relaxation  $\alpha$  diminue et la fréquence associée  $\omega_\alpha$  augmente.

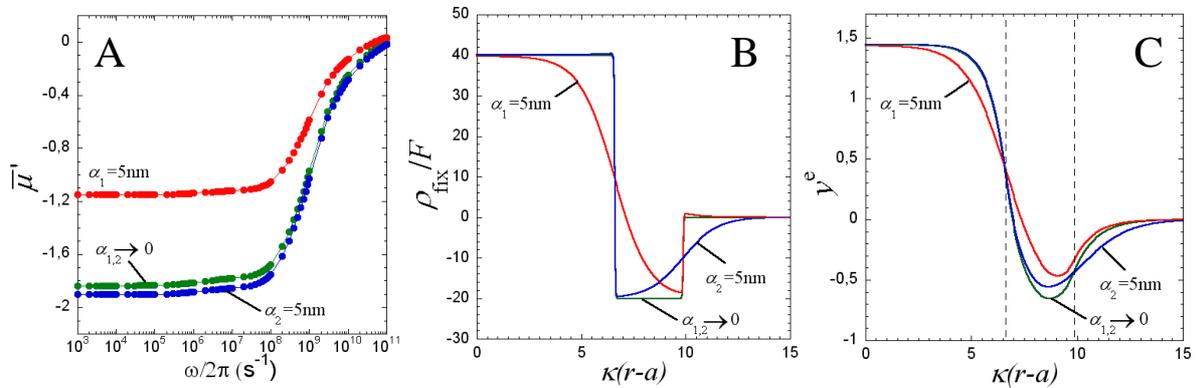
Notons que  $\omega_{MW}$  ne dépend pas de la fraction volumique  $\phi$  et reste proche de  $3.10^7 \text{s}^{-1}$ . Ce résultat est attendu puisque d’une part la relaxation MW est régie par la migration des ions dans la DCE, et d’autre part nous avons exclu le recouvrement des DCE de particules voisines. La distance caractéristique de migration des ions reste donc inchangée durant l’ajout de particules dans la solution.

Les variations de la mobilité réelle sans dimension  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$ , correspondantes aux variations de  $\Delta\varepsilon'(\omega)$ , sont illustrées dans la Figure 4.10D. Les résultats prédisent une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  lorsque  $\phi$  augmente. Ceci est la conséquence du fait que les interactions hydrodynamiques entre les particules, lorsque leur concentration dans la solution augmente, gênent leur mouvement.

#### 4.2.5. Influence du degré d'hétérogénéité dans la distribution de segments polymériques sur la mobilité dynamique.

La Figure 4.12A représente les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  pour des suspensions diluées de particules molles de type cœur/couronne dont l'enveloppe perméable est composée de deux couches de propriétés physico-chimiques différentes. Le degré d'hétérogénéité spatiale de la distribution des segments polymères à l'intérieur de chaque couche molle est varié à l'aide des paramètres  $\alpha_{i=1,2}$ . La distribution des segments dans la couche  $i$  est homogène lorsque  $\alpha_i \rightarrow 0$ , et la distribution est hétérogène pour  $\alpha_i > 0$ . Les particules sont caractérisées par une mollesse hydrodynamique  $\lambda_2^0 d_2 = 2$  et sont dispersées dans une solution de concentration  $c^* = 10$  mM. La couche 2 est chargée négativement avec  $\rho_2^0/F = -20$  mM et la couche 1 est chargée positivement avec  $\rho_1^0/F = \beta_1 \rho_2^0/F = 40$  mM.

Les Figures 4.12B et 4.12C représentent respectivement les profils de concentrations en charge fixes  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  et de potentiels électrostatiques à l'équilibre  $y^e(x)$ , à travers l'interphase, correspondants aux variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  obtenues dans la Figure 4.12A.



**Figure 4.12.** (A) Variations en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  de la mobilité dynamique réelle adimensionnée  $\bar{\mu}'(\omega)$  dans une suspension de particules enveloppées de deux couches molles pour différents paramètres  $\alpha_i$  (indiqué). Distribution de la densité de charge  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  (panel B) et de potentiel électrostatique d'équilibre adimensionné  $y^e(x)$  (panel C) correspondantes à travers l'interphase. Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $c^* = 10 \text{ mM}$  ;  $\lambda_2^0 d_2 = 2$  ;  $\beta_1 = -2$  ;  $\beta_1^H = 2$  ;  $\rho_2^0/F = -20 \text{ mM}$  ;  $d_1 = 20 \text{ nm}$  ;  $d_2 = 10 \text{ nm}$  ;  $\phi = 0,01$  ;  $z = 1$ .

Les spectres diélectriques ne sont pas représentés ici puisque que  $\Delta\mathcal{E}'(\omega)$  est indépendant de  $\alpha_{i=1,2}$ . Comme la magnitude de  $\Delta\mathcal{E}'(\omega)$  est déterminée par  $Q_{\text{tot}}$ , elle ne dépend pas des

variations de  $\alpha_{i=1,2}$  et donc de l'hétérogénéité spatiale dans la distribution des segments polymères. Rappelons que le paramètre  $\chi$  dans l'équation (4.2) assure le maintien de la quantité de charge sous la variation de  $\alpha_{i=1,2}$ . La fréquence de relaxation  $\omega_\alpha$  n'est pas contrôlée par les propriétés physico-chimiques de l'enveloppe polymérique. Par conséquent, à  $\lambda_2^0 d_2$  constant, les spectres diélectriques sont parfaitement superposables sous les variations de  $\alpha_{i=1,2}$ .

Tout d'abord, examinons les variations de la densité de charge à travers l'interphase (Figure 4.12B). Pour  $\alpha_{i=1,2} \rightarrow 0$ , la distribution des segments polymériques dans les couches 1 et 2 est homogène. On a alors un profil de densité de charge fixe  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  « en escalier » (courbe verte). Lorsque  $\alpha_2$  augmente ( $\alpha_2 = 5$  nm – courbe bleue), les segments polymériques de la couche 2 se déploient vers la solution électrolytique. La distribution de  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  est caractérisée par une décroissance graduelle de  $|\rho_{\text{fix}}(x)/F|$  depuis le cœur de la couche 2 vers le milieu extérieure. Lorsque  $\alpha_1$  augmente ( $\alpha_1 = 5$  nm – courbe rouge), la transition entre la couche 1 et la couche 2 est caractérisée par une décroissance continue de  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  depuis le cœur de la couche 1 vers la couche 2.

A une fréquence donnée, les résultats présentés dans la Figure 4.12A révèlent une légère augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  quand la couche 2 devient hétérogène ( $\alpha_2 = 5$  nm). Pour comprendre ces résultats, examinons les variations de potentiels électrostatiques à l'équilibre  $y^e(x)$  associées (Fig. 4.12C). Les lignes pointillées représentent les transitions couche 1/couche 2 et couche 2/solution dans la limite  $\alpha_{i=1,2} \rightarrow 0$ . Ici, la perméabilité hydrodynamique de la couche 2 est donnée par  $\lambda_2^0 d_2 = 2$ . La région où la pénétration du flux électroosmotique est significative (*i.e.*  $x > \kappa(d_1 + d_2/2)$ ) est caractérisée par des potentiels électrostatiques à l'équilibre plus importants quand  $\alpha_2$  augmente. Par conséquent la mobilité de la particule doit augmenter lorsque  $\alpha_2$  augmente également. De plus lorsque le flux électroosmotique pénètre dans la structure molle de la particule, celui-ci sonde aussi les forces de friction exercées par les segments polymères. Augmenter le degré d'hétérogénéité de l'interphase couche 1/solution implique une augmentation de la force de friction exercée par les segments polymères sur le flux dans la zone d'intérêt (*i.e.*  $x > \kappa(d_1 + d_2/2)$ ). Cet effet hydrodynamique

tend à décélérer la particule lorsque  $\alpha_2$  augmente et agit contre l'effet électrostatique qui tend à accélérer la particule. Ici, nous observons une légère augmentation de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  sous l'augmentation de  $\alpha_2$ . L'effet électrostatique surpasse légèrement l'effet hydrodynamique.

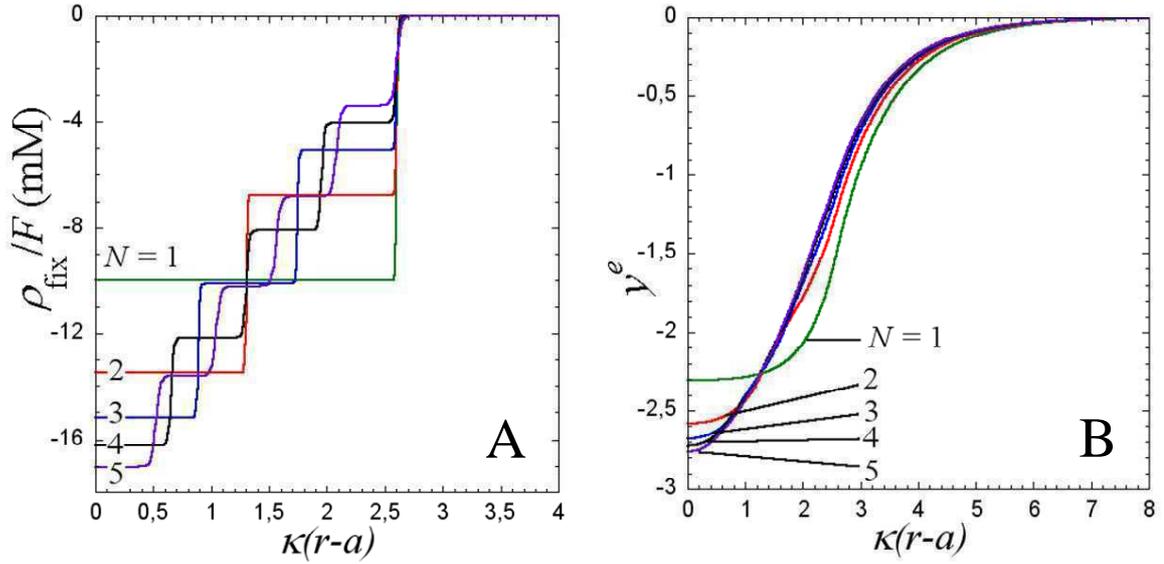
A l'inverse, une augmentation de  $\alpha_1$  génère une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  quelle que soit  $\omega$ . En effet, augmenter  $\alpha_1$  a pour résultat une diminution de  $|\rho_{\text{fix}}(x)|$  (voir la fig. 4.12B) et une augmentation de la friction exercée par les segments polymères (voir les équations (4.5) et (4.6)) dans la zone sondée par le flux électroosmotique, c'est-à-dire pour  $x > \kappa(d_1 + d_2/2)$ .

#### 4.2.6. Impact du nombre de couches perméables $N$ enveloppant des particules en suspension sur leur réponse diélectrique et leur mobilité dynamique.

La dernière étude porte sur l'impact de la quantité de couches perméables entourant des particules en suspension sur la réponse diélectrique et la mobilité dynamique de la suspension.

Les particules, enveloppées de  $N$  couches perméables homogènes de même épaisseur  $d_{i=1\dots N}$ , sont suspendues dans une solution de concentration  $c^*=1$  mM. Les variations de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  et  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de  $\omega/2\pi$  sont déterminées pour des suspensions de particules composées d'un cœur dur entouré de  $N=1$  à 5 couches perméables en maintenant la charge totale dans l'interphase molle  $Q_{\text{tot}}$  et l'épaisseur de l'interphase ( $d_{\text{tot}} = \sum_{i=1\dots N} d_i$ ) constantes sous la variation de  $N$ . De plus, les interphases molles sont définies de telle sorte que les couches les plus internes (couches  $i=1$ ) sont  $N$  fois plus chargées que les couches externes (couches  $i=N$ ), les couches  $i=2$  sont  $N-1$  fois plus chargées que les couches  $i=N$  et ainsi de suite avec  $\beta_{i=1\dots N} = N-i+1$ . La Figure 4.13A représente la distribution de la densité de charges  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  à travers les interphases molles pour  $N=1$  à 5 et les distributions de potentiel électrostatique à l'équilibre  $y^e(x)$  correspondantes sont illustrées dans la Figure 4.13B.

Les variations de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  en fonction de  $\omega/2\pi$  correspondantes ont été déterminées pour trois perméabilités hydrodynamiques de la structure molle différentes et sont représentées dans la Figure 4.14A-C avec (A)  $1/\lambda_N^0 \rightarrow 0$ , (B)  $1/\lambda_N^0 = 5$  nm et (C)  $1/\lambda_N^0 = 10$  nm.

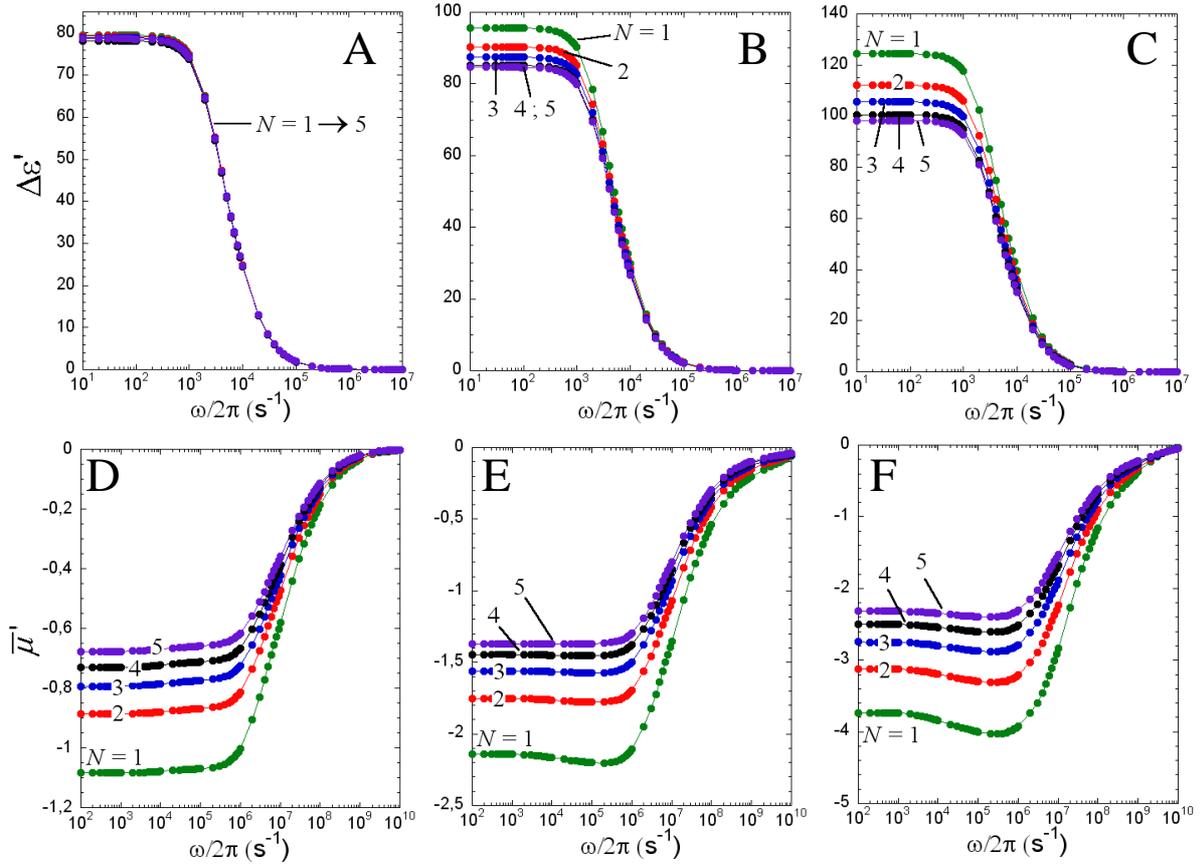


**Figure 4.13.** Distribution de la densité de charge  $\rho_{\text{fix}}(x)/F$  (A) et du potentiel local à l'équilibre  $y^e(x)$  (B) à travers l'interphase de particules enveloppées de  $N = 1$  à  $N = 5$  couches perméables (indiqué). La charge totale portée par la particule et l'épaisseur de l'enveloppe polymérique globale sont gardées constantes avec  $d_{\text{tot}} = 25\text{nm}$ . Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $c^* = 1\text{mM}$  ;  $\beta_i = \beta_i^{\text{H}}$  ;  $\phi = 0,01$  ;  $\alpha_i \rightarrow 0$  ;  $z = 1$ .

Pour  $1/\lambda_N^0 \rightarrow 0$ , les flux électroosmotiques ne pénètrent pas dans la particule et se développent à l'extérieur de la particule. La région sondée par les flux est donc située à l'extérieur de la particule ( $x > \kappa d_{\text{tot}}$ ) où les variations de  $y^e(x)$  varient très peu en fonction de  $N$ . Comme  $Q_{\text{tot}}$  est maintenue constante sous l'augmentation de  $N$ , les spectres diélectriques se superposent.

Pour  $1/\lambda_N^0 = 5 \text{ nm}$  et  $1/\lambda_N^0 = 10 \text{ nm}$ ,  $y^e(x)$  diminue lorsque  $N$  augmente dans la région où la pénétration du flux électroosmotique est significative (*i.e.*  $x > 2,1$  et  $x > 1,5$  respectivement). Par conséquent, à  $\omega$  donné et à  $Q_{\text{tot}}$  constant,  $\Delta\epsilon'(\omega)$  diminue lorsque le nombre de couches entourant la particule augmente.

Les variations de  $\bar{\mu}'(\omega)$  en fonction de  $\omega/2\pi$  correspondantes aux variations de  $\Delta\epsilon'(\omega)$  (Fig. 4.14A-C) sont représentées dans la Figure 4.14D-F. La perméabilité hydrodynamique de la structure molle de la particule pour chaque panel est donnée par : (D)  $1/\lambda_N^0 \rightarrow 0$ , (E)  $1/\lambda_N^0 = 5 \text{ nm}$  et (F)  $1/\lambda_N^0 = 10 \text{ nm}$ .



**Figure 4.14.** Variations de l'incrément diélectrique  $\Delta\varepsilon'(\omega)$  (panel A-C) et de la mobilité dynamique réelle adimensionnalisée  $\bar{\mu}'(\omega)$  (panel D-F) en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  dans une suspension de particules enveloppées de  $N = 1$  à  $N = 5$  couches perméables (indiqué) caractérisées par différentes mollesses hydrodynamiques :  $1/\lambda_N^0 \rightarrow 0$  (panels A et D) ;  $1/\lambda_N^0 = 5$  nm (panels B et E) et  $1/\lambda_N^0 = 10$  nm (panels C et F). Autres paramètres si non indiqués dans le Tableau 4.1 :  $c^* = 1\text{mM}$  ;  $\beta_N = \beta_N^H$  ;  $a = 300\text{nm}$  ;  $\alpha_N \rightarrow 0$  ;  $z = 1$ .

Pour les trois perméabilités considérées, les figures montrent une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  sous l'augmentation de  $N$ , à  $\omega$  donné et à  $Q_{\text{tot}}$  constant. Prenons par exemple la situation où la particule n'est pas perméable ( $1/\lambda_N^0 \rightarrow 0$ ), les flux électroosmotiques sondent les gradients de potentiel à l'extérieur de la structure molle ( $x = \kappa d_{\text{tot}} \approx 2,6$ ). Ici,  $|\rho_{\text{fix}}(x = \kappa d_{\text{tot}})|$  diminue lorsque  $N$  augmente, d'où la diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  observée.

Cette explication s'applique également pour les cas où  $1/\lambda_N^0 = 5$  et  $10$  nm où la magnitude des distributions de densité de charge et de potentiels électrostatiques à l'équilibre diminue dans les régions de pénétration du flux lorsque le nombre de couches enveloppant la particule

augmente. On a alors une diminution de  $|\bar{\mu}'(\omega)|$  sous l'augmentation de  $N$  malgré que la conservation de la charge totale dans l'intégralité de la structure polymérique.

### 4.3. Synthèse des principaux résultats théoriques.

Cette étude théorique permet de prédire les variations de la permittivité diélectrique et de la mobilité dynamique de suspensions concentrées de (bio)particules molles multicouches diffuses et sphériques en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué. Les impacts des principaux paramètres définissant les particules et leur milieu de suspension sur la réponse diélectrique et la mobilité dynamique ont été analysés.

En particulier les résultats obtenus ont montré que les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques des couches polymériques internes impactent les magnitudes et variations en fréquence de la mobilité dynamique, de l'incrément diélectrique et de la perte diélectrique, en particulier à faible force ionique et pour  $\lambda_N^0 d_N \leq 1$ .

D'une part, la permittivité est essentiellement gouvernée par la charge portée par l'ensemble des couches perméables qui enveloppent le cœur dur de la particule. Négliger la charge des couches internes peut conduire à une sur/sous-estimation importante de la magnitude de la réponse diélectrique (voir pour exemple la Figure 4.2). De plus, les résultats décrits dans la section précédente ont clairement démontré qu'assimiler une interphase multicouche à une couche unique de même charge totale peut engendrer une grande disparité en termes de magnitude entre la permittivité réelle (interphase multicouche) et la permittivité calculée (interphase monocouche).

D'autre part, la contribution des propriétés des couches internes dans les variations en fréquence de la mobilité dynamique est plus complexe puisque la magnitude de la mobilité est directement reliée aux gradients de potentiels électrostatiques sondés par les flux électroosmotiques développés autour et au sein de la particule suite à son déplacement sous l'effet du champ électrique. Plus la perméabilité hydrodynamique de la particule sera importante et la force ionique de son milieu de suspension sera faible, plus la mobilité dépendra de la distribution des segments polymères chargés dans les couches internes. De même, il est important de ne pas assimiler une interphase multicouche à une interphase monocouche de même charge totale car une telle approximation conduit à une mobilité

dynamique possiblement erronée en termes de signe et de magnitude, en particulier à basses fréquences (voir la Figure 4.14).

Le caractère homogène/hétérogène de la distribution des segments polymériques entre chaque couche et entre la couche externe et la solution impacte également les variations de la mobilité dynamique en fonction de la fréquence. Négliger la nature diffuse de la particule molle peut conduire à une sur/sous-estimation de la magnitude de la mobilité dynamique à une fréquence donnée.

Par conséquent, cette étude théorique se présente comme une extension nécessaire aux travaux de Ahualli *et al.* [11] (AC électrocinétique de suspensions de particules molles monocouches caractérisées par une distribution spatiale homogène des charges fixes) pour la compréhension des propriétés électrodynamiques des (bio)particules molles monocouches et multicouches telles que les bactéries, les virus, les acides humiques ou les particules microgels. Cette analyse constitue une base pour le traitement et la compréhension de travaux expérimentaux portant notamment sur la réponse diélectrique de suspensions concentrées de souches bactériennes *Escherichia coli* K-12 (notées *E. coli*) via la DRS\*. Cette étude sera effectuée par Jennifer Martin, dont la thèse vient de débiter au LEM (octobre 2011-septembre 2014 – *dynamique de spéciation de cations métalliques aux interphases molles biotiques (bactéries) et abiotiques (hydrogels)*).

#### **4.4. Application aux expériences : manipulations exploratoires.**

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la démarche effectuée pour la mise au point d'un montage expérimental et d'un protocole approprié pour l'étude des propriétés électrodynamiques de suspensions colloïdales composées de (bio)particules via la DRS.

Sur le principe, la DRS est une technique relativement simple. La suspension de particules est injectée dans une cellule cylindrique thermostatée (voir le schéma 4.18A pour illustration). Aux extrémités de la cellule sont présentes deux électrodes de platine « noircies » (une fine couche de platine est déposée par électrolyse sur l'électrode de platine) entre lesquelles un champ électrique alternatif est appliqué à l'aide d'un analyseur d'impédance. L'impédance entre ces mêmes électrodes est mesurée en fonction de la

---

\* Des informations supplémentaires sur les souches bactériennes sont disponibles dans le §5.1.2 du chapitre 5.

fréquence du champ appliqué. A partir de ce signal la permittivité diélectrique peut être déterminée (détails plus tard dans le texte).

En appliquant une différence de potentiel entre les deux électrodes, les électrodes deviennent légèrement chargées. Ces charges de signe opposé entraînent l'établissement de DCEs à la surface des électrodes et une séparation des charges dans la cellule de mesure (déplacement des ions libres d'une électrode à l'autre et à l'intérieur des DCEs). On parle de polarisation d'électrode. Les variations de permittivité diélectrique, en fonction de la fréquence du champ, associées à la polarisation d'électrode ont été déterminées dans cette thèse dans le cadre de l'analyse de la dynamique de spéciation dans des films ligands (Chapitre 3 équation 3.34) :

$$\varepsilon_{PE}^*(\omega) = \varepsilon_r \left[ \left(1 + j\omega/\omega_{EDL}\right)^{-1} \cdot \left\{ \left(\frac{\omega_H}{j\omega + \omega_{EDL}}\right)^{1/2} \cdot \frac{\cosh\left(2\left[(j\omega + \omega_{EDL})/\omega_H\right]^{1/2}\right) - 1}{\sinh\left(2\left[(j\omega + \omega_{EDL})/\omega_H\right]^{1/2}\right)} - 1 \right\} + 1 \right]^{-1} \quad (4.71)$$

avec  $\omega_{EDL} = \kappa^2 D_{\pm}$  et  $\omega_H = 4D_{\pm}/H^2$  où  $H$  est distance de séparation entre les deux électrodes.

Le comportement asymptotique de l'incrément et de la perte diélectrique à basses fréquences est donné par :

$$\Delta\varepsilon'_{PE} \propto \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{-3/2} \quad (4.72)$$

et

$$\varepsilon''_{PE} \propto \left(\frac{\omega}{\omega_{EDL}}\right)^{-1} \quad (4.73)$$

avec  $\omega_c = \omega_{EDL}^{2/3} (\omega_H / 2)^{1/3} \propto H^{-2/3}$ .

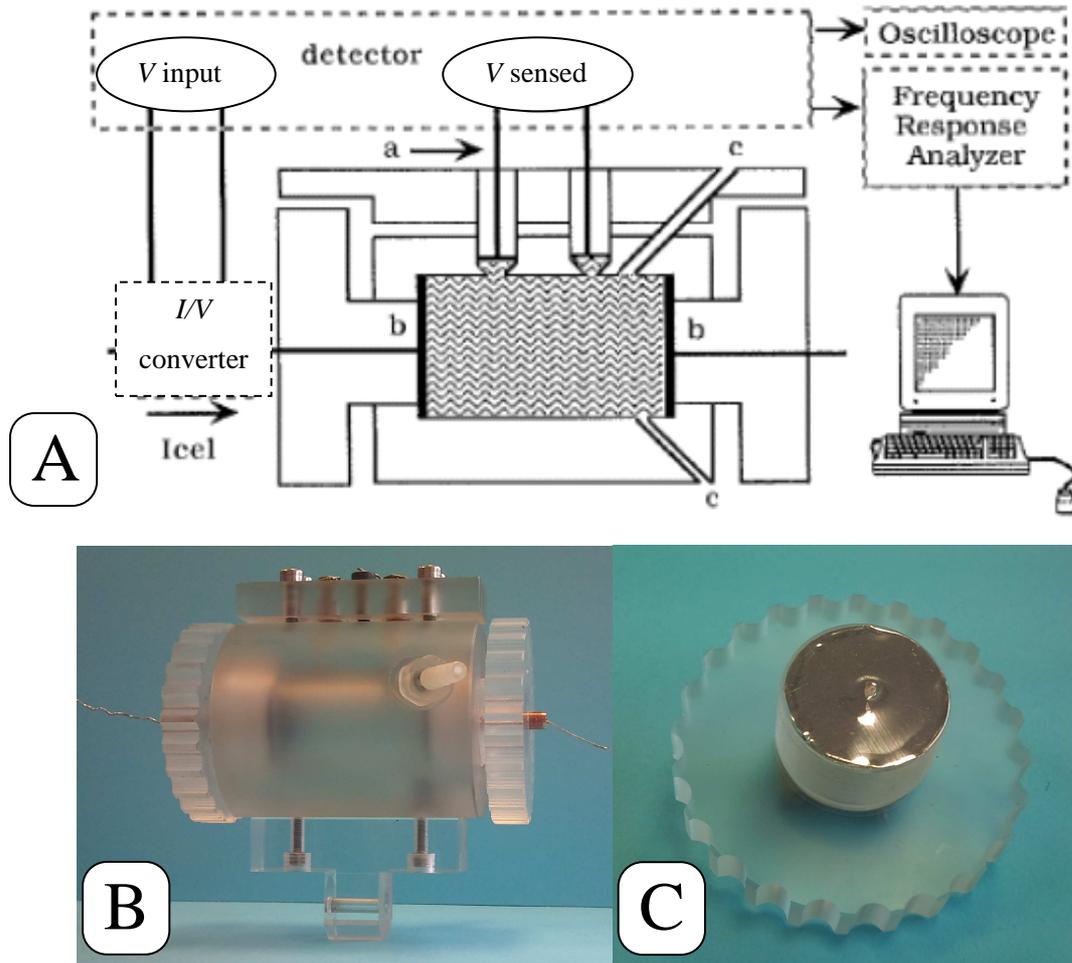
Considérons une expérience de DRS. La suspension analysée (composée de particules molles dispersées dans une solution de concentration  $c^* = 1\text{mM}$ ) est introduite dans une cellule de DRS dans laquelle les électrodes sont séparées par une distance  $H$  fixée à 2 cm. Sous l'application du champ, les électrodes se polarisent. Dans ces conditions, la fréquence de relaxation associée à la polarisation des électrodes est estimée à  $\omega_{PE} \approx 10\text{ s}^{-1}$  et l'incrément diélectrique à basse fréquence  $\Delta\varepsilon'_{PE}(\omega \rightarrow 0)$  est de l'ordre de  $10^7$  (voir les équations (3.36) du Chapitre 3). Supposons que les particules en suspensions ont un cœur dur (de rayon  $a = 300\text{ nm}$ ) est enveloppé de deux couches molles (avec  $d_1 = 20\text{ nm}$ ,  $d_2 = 5\text{ nm}$ ,  $\rho_2^0/F = -10\text{ mM}$ ,

$\lambda_2^0 d_2 = 1$  et  $\alpha_{i=1,2} \rightarrow 0$ ) (voir la Figure 4.2A). La permittivité basse fréquence ( $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$ ) et la fréquence de relaxation  $\omega_\alpha$  associée à l'établissement d'une polarisation de concentration autour des particules (relaxation  $\alpha$ ) sont estimées à  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0) < 400$  et  $\omega_\alpha \approx 5.10^3 \text{ s}^{-1}$ .  $\Delta\epsilon'_{PE}(\omega \rightarrow 0)$  est donc supérieur à  $\Delta\epsilon'(\omega \rightarrow 0)$  de plus de quatre ordres de grandeur. Dans cette situation le signal associé à la polarisation des électrodes masque complètement le signal associé à la polarisation de concentration autour des particules (que l'on veut mesurer) même si  $\omega_{PE}$  est inférieur à  $\omega_\alpha$ . Il est donc nécessaire d'éliminer la réponse diélectrique due à la polarisation des électrodes du signal brut mesuré qui comprend les contributions de la polarisation de concentration *et* de la polarisation des électrodes. Pour cela, différentes techniques sont possibles. Parmi elles, deux ont été tentées dans le cadre de cette thèse.

(i) *Cellule à 4 électrodes.*

Cette cellule nous a été prêtée par le laboratoire *Physical Chemistry and Colloid Science* à Wageningen (Pays-Bas). Son utilisation est la solution idéale aux problèmes de polarisation d'électrodes car l'impédance mesurée est intégralement reliée à la polarisation des DCEs des particules en suspension (pas de contribution des effets d'électrode). Le champ électrique est appliqué entre deux électrodes qui se polarisent. L'astuce est d'utiliser deux électrodes supplémentaires pour mesurer l'impédance. Le courant créé à travers ces deux électrodes de mesures est très faible et la polarisation à leur surface est négligeable. Une représentation de cette cellule est proposée dans la Figure (4.15).

Cependant, l'utilisation d'une cellule à quatre électrodes souffre d'un inconvénient majeur : le dispositif électronique pour mesurer l'impédance est très complexe et le laboratoire ne possédait pas des compétences pour réaliser un tel dispositif électronique quelque peu instable. Nous nous sommes donc tournés vers un système expérimental plus commun constitué d'une cellule basique à deux électrodes. Pour cela, nous avons « transformé » la cellule à quatre électrodes en une cellule à deux électrodes. Le signal, mesuré directement par l'impédancemètre, comprend la contribution des particules *et* la contribution des électrodes. Ne pouvant pas modifier la géométrie de la cellule et notamment



**Figure 4.15.** (A) Illustration du dispositif à 4 électrodes pour des mesures de permittivité. a : électrodes de mesures ; b : électrodes entre lesquelles le champ électrique est appliqué ; c : ouvertures pour l'introduction de la suspension colloïdale (d'après Kijlstra et al.[20]). Photographie (B) de la cellule à quatre électrodes utilisées dans cette thèse et (C) d'une électrode notée b dans le schéma représenté dans la panel A.

la séparation des électrodes, nous avons choisi de traiter les résultats selon la méthode dite de « dérivée logarithmique » pour supprimer la polarisation des électrodes de notre signal.

(ii) *Dérivée logarithmique.*

Cette méthode consiste à séparer par le calcul la contribution des électrodes et la contribution des particules dans la permittivité diélectrique brute mesurée  $\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - j\epsilon''(\omega)$  via la cellule à deux électrodes. La perte diélectrique  $\epsilon''(\omega)$  est définie par :

$$\epsilon''(\omega) = \epsilon''_{PE}(\omega) + \epsilon''_{\alpha}(\omega) \quad (4.74)$$

où  $\varepsilon''_{PE}(\omega)$  et  $\varepsilon''_{\alpha}(\omega)$  sont les pertes diélectriques associées à la polarisation des électrodes et à la relaxation  $\alpha$ , respectivement. Pour supprimer  $\varepsilon''_{PE}(\omega)$  de  $\varepsilon''(\omega)$ , une nouvelle fonction est introduite :

$$\varepsilon''_D(\omega) = -\frac{\pi}{2} \frac{\partial \varepsilon'(\omega)}{\partial \ln \omega} = \varepsilon''_{D,PE}(\omega) + \varepsilon''_{D,\alpha}(\omega). \quad (4.75)$$

où  $\varepsilon''_{D,PE}(\omega)$  et  $\varepsilon''_{D,\alpha}(\omega)$  sont les dérivées logarithmiques de la permittivité diélectrique associées à la polarisation des électrodes et à la relaxation  $\alpha$ , respectivement.

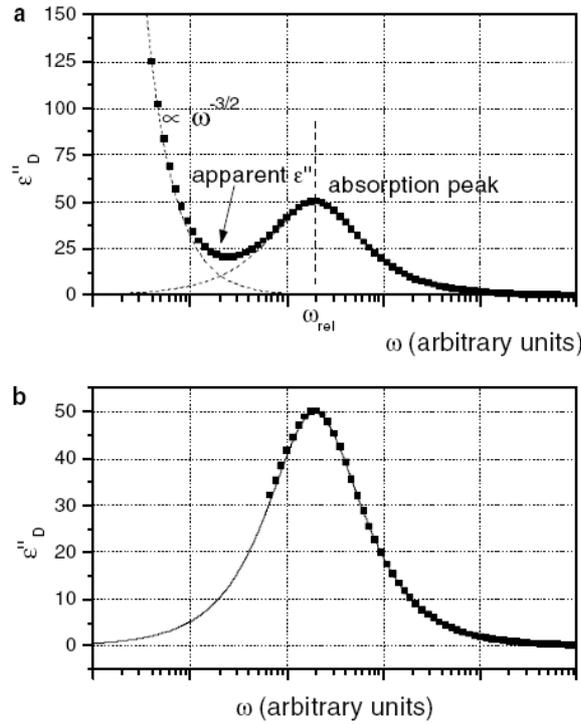
En considérant les équations (4.72) et (4.73) et la définition de  $\omega_c$ ,  $\varepsilon''_{D,PE}(\omega)$  dépend de  $\omega$  et  $H$  selon :

$$\varepsilon''_{D,PE}(\omega) \propto \omega^{-3/2} H^{-1}. \quad (4.76)$$

La perte diélectrique recherchée  $\varepsilon''_{\alpha}(\omega)$  est similaire à  $\varepsilon''_{D,\alpha}(\omega)$  d'où  $\varepsilon''_{\alpha}(\omega) = \varepsilon''_{D,\alpha}(\omega)$  [21]. La comparaison entre les équations (4.73) et (4.76) montre que  $\varepsilon''_{D,PE}(\omega)$  diminue plus rapidement lorsque  $\omega$  augmente que  $\varepsilon''_{PE}(\omega)$  puisque l'on a  $\varepsilon''_{D,PE}(\omega) \propto \omega^{-3/2}$  et  $\varepsilon''_{PE}(\omega) \propto \omega^{-1}$ . Comme  $\varepsilon''_{\alpha}(\omega) = \varepsilon''_{D,PE}(\omega)$ , le signal dû à la relaxation  $\alpha$  est mieux séparé du signal dû à la polarisation dans les variations de  $\varepsilon''_D(\omega)$  par rapport à  $\varepsilon''(\omega)$ . C'est pourquoi il est judicieux de traiter les résultats en utilisant la fonction  $\varepsilon''_D(\omega)$ .

La méthode de dérivée logarithmique est détaillée dans la publication de Jimenez *et al.* [21], c'est pourquoi nous utiliserons leurs figures pour décrire le traitement des résultats.

La dérivée logarithmique de la réponse diélectrique  $\varepsilon''_D(\omega)$  est d'abord calculée avec l'équation (4.75). Les variations typiques en fonction de  $\omega$  de  $\varepsilon''_D(\omega)$  sont représentées dans la Figure 4.16A. A basses fréquences, la courbe manifeste une décroissance de  $\varepsilon''_D(\omega)$  proportionnelle à  $\omega^{-3/2}$ , signature des effets de polarisation des électrodes. Cette décroissance est suivie par l'apparition d'un « pic » d'absorption dû à la polarisation  $\alpha$  autour des particules colloïdales. Nous pouvons donc soustraire la partie proportionnelle à  $\omega^{-3/2}$  des variations de  $\varepsilon''_D(\omega)$  pour obtenir la perte diélectrique provenant exclusivement de la relaxation  $\alpha$  (voir Figure 4.16B).



**Figure 4.16.** (a) Variations typiques de  $\epsilon''_D(\omega)$ .  $\epsilon''_D(\omega)$  est la superposition de  $\epsilon''_{D,EP}(\omega) \propto \omega^{-3/2}$  (effet des électrodes) et de  $\epsilon''_{D,\alpha}(\omega)$  (effet de la relaxation  $\alpha$ ). (b) Perte diélectrique  $\epsilon''_{D,\alpha}(\omega)$  de la suspension après soustraction de  $\epsilon''_{D,EP}(\omega)$  de  $\epsilon''_D(\omega)$  (d'après Jimenez et al.[21]).

Les variations de  $\epsilon''_\alpha(\omega)$  obtenues sont ensuite reproduites (et extrapolées sur la gamme de fréquence où la polarisation des électrodes masquaient le signal) à l'aide d'expressions capables de modéliser la dépendance fréquentielle de la réponse diélectrique telles que les expressions de Cole-Cole [22-23] ou Havriliak-Negami [24]. En utilisant les paramètres obtenus lors de la modélisation de  $\epsilon''_\alpha(\omega)$ , l'incrément diélectrique  $\Delta\epsilon'_\alpha(\omega)$  est finalement reconstruit en utilisant ces mêmes modèles.

#### 4.4.1. Déroulement des expériences : Test sur des particules de latex.

Pour valider le dispositif expérimental et les résultats obtenus, nous avons effectué des expériences tests sur des particules de latex commerciales, de rayon 520nm, manufacturées par *Microgenics Corporation* (Fremont, CA), avec pour but de comparer nos propres résultats avec d'autres résultats disponibles dans la littérature [21]. La cellule utilisée est une cellule à 4 électrodes dont nous avons retiré les deux électrodes de mesures. Celle-ci est reliée à un analyseur d'impédance 4284A de la société Agilent capable de générer un courant alternatif

de pulsation comprise entre 40Hz et 110 MHz et de mesurer une impédance complexe  $Z^*(\omega)$  sur toute cette gamme de fréquence. La cellule utilisée nous donne accès à une gamme de fréquence plus restreinte allant de 40Hz à 500kHz. Cette limitation n'est pas problématique car la relaxation  $\alpha$ , sondée par la DRS, intervient typiquement dans ce domaine de fréquences. L'analyseur d'impédance est connecté à un ordinateur pour la récupération et le traitement des résultats.

La manipulation débute par une compensation des câbles reliant l'analyseur à la cellule. Pour cela,  $Z^*(\omega)$  est mesuré sur la gamme de fréquence nous intéressant (de 40Hz à 500kHz) en court-circuit. L'opération est répétée mais dans des conditions de circuit ouvert. L'analyseur d'impédance effectue alors lui-même les opérations pour retirer le signal apporté par les câbles du signal mesuré.

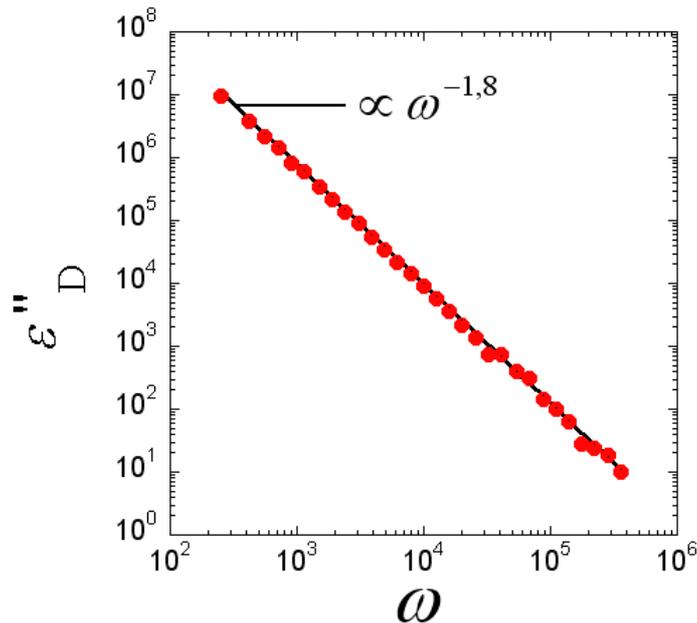
La constante de cellule  $\Lambda$  est ensuite déterminée en mesurant  $Z^*(\omega)$  de différentes solutions tampon de conductivité  $\sigma$  connue.  $Z^*(\omega)$  étant constante sur la gamme de fréquence analysée, il est alors facile de calculer  $\Lambda$  en utilisant la simple relation  $\Lambda = |Z| \sigma$  où  $|Z|$  est le module de  $Z^*(\omega)$ .

Notre premier test était de vérifier la dépendance en  $\omega^{-3/2}$  du signal d'un fond ionique seul (la seule contribution provient de la polarisation des électrodes). Les résultats montrés proviennent d'expériences effectuées sur une solution tampon de conductivité  $\sigma = 1413\mu\text{S.cm}^{-1}$  (à 25°C).

La permittivité réelle  $\varepsilon'(\omega)$  est calculée en utilisant la relation :

$$\varepsilon'(\omega) = \frac{\Lambda Z''(\omega)}{[Z'^2(\omega) + Z''^2(\omega)] \omega \varepsilon_0} \quad (4.77)$$

La dérivée logarithmique  $\varepsilon''_D(\omega)$  est ensuite déterminée avec l'équation (4.75). Les variations de  $\varepsilon''_D(\omega)$  avec la fréquence sont montrées dans la Figure 4.17 (points rouges) dans une représentation log-log. Comme attendu,  $\log(\varepsilon''_D(\omega))$  est linéairement dépendant de  $\log(\omega)$  avec  $\log \varepsilon''_D(\omega) \propto -1,8 \log \omega$ , ou  $\varepsilon''_D(\omega) \propto \omega^{-1,8}$ . Mais contrairement à la théorie  $\varepsilon''_D(\omega)$  n'est pas proportionnel à  $\omega^{-3/2}$ . Ceci s'explique par le fait que les électrodes ne sont pas parfaitement planes, parfaitement polarisables et de longueur infinie comme supposé dans la théorie. C'est pourquoi nous observons une légère déviation avec  $\varepsilon''_D(\omega) \propto \omega^{-1,8}$ .



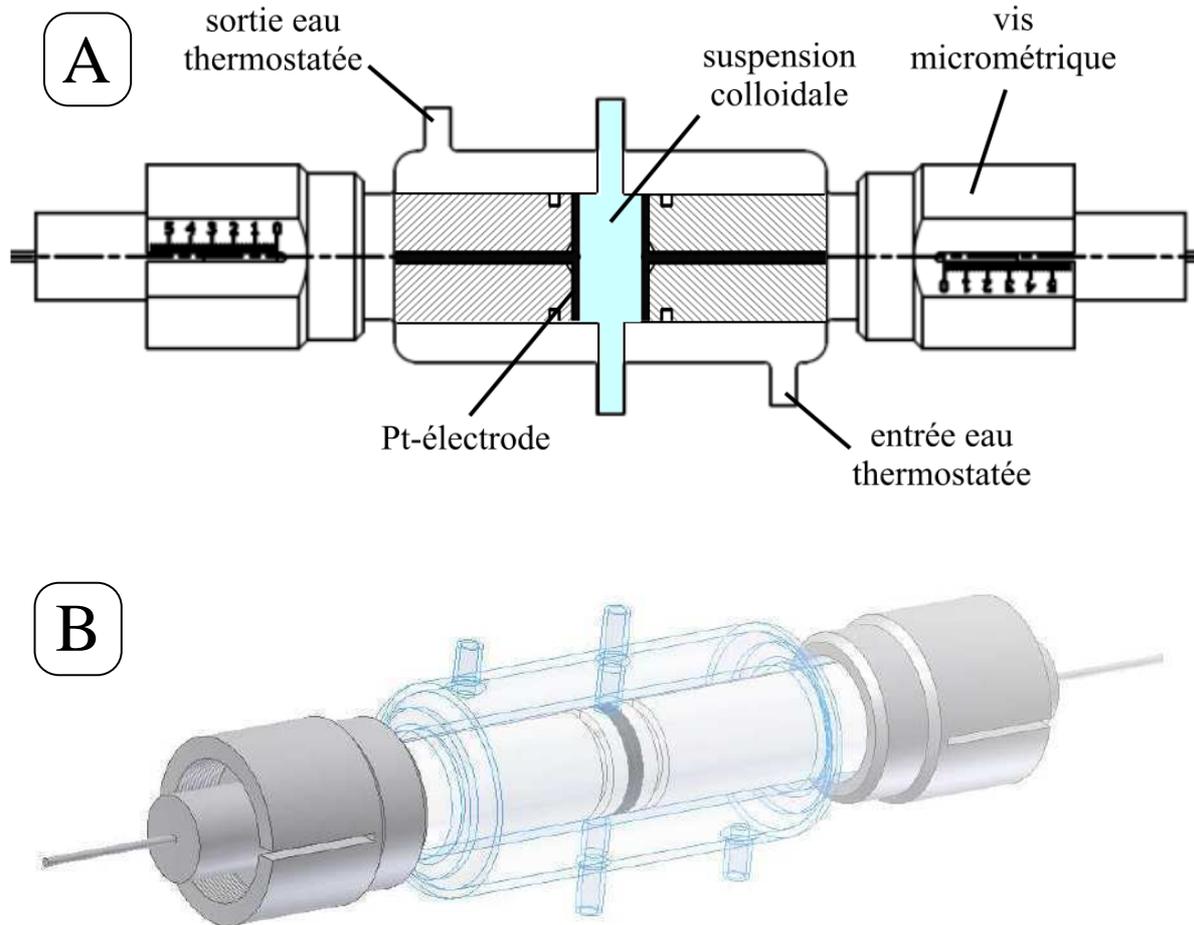
**Figure 4.17.** Variations  $\varepsilon''_D(\omega)$  en fonction de la fréquence pour une solution de conductivité  $\sigma = 1413 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (points rouges) et meilleur fit obtenu (ligne noire).

L'étape suivante était d'injecter dans la cellule une suspension de particules de latex de fraction volumique  $\phi > 2\%$ . Le fond ionique utilisé est une solution de chlorure de sodium (KCl) de concentration 0,5mM. Mais après traitement, les variations de  $\varepsilon''_D(\omega)$  ne nous ont pas permis de faire ressortir le signal propre de la suspension. En effet, le signal obtenu semble provenir essentiellement des effets des électrodes même si celui-ci manifeste une décroissance rapide lorsque la fréquence augmente. A la vue des résultats obtenus par Jimenez *et al.* [21], le pic d'absorption résultant de la relaxation  $\alpha$  aurait dû apparaître dans les variations de  $\varepsilon''_D(\omega)$ .

Après de nombreux tests et discussions, nous avons déterminé que la cellule utilisée n'est pas adaptée aux mesures de dispersion diélectrique à basses fréquences pour les raisons suivantes.

Premièrement, la cellule utilisée n'est pas thermostatée alors que le signal mesuré dépend de la température. Deuxièmement, la géométrie de la cellule est fixée de telle sorte que la distance  $H$  séparant les électrodes ne peut pas être modifiée. Les électrodes sont séparées de 4cm environ ce qui représente une séparation plus importante que la séparation typique de cellules à deux électrodes (environ 2cm ajustables). De plus, même si l'utilisation de la méthode de dérivée logarithmique ne le nécessite pas obligatoirement, il est tout de même

conseillé d'effectuer les mesures d'impédances pour différentes valeurs de  $H$ , puisque ce paramètre contrôle en grande partie la réponse diélectrique générée par les effets des électrodes et n'influe pas sur la relaxation  $\alpha$ .



**Figure 4.18.** (A) Illustration de la cellule à 2 électrodes élaborée au laboratoire et (B) Représentation en 3 dimensions de cette même cellule.

Par conséquent, une cellule à deux électrodes schématisée dans la Figure 4.18 a été construite. La température de l'échantillon peut être contrôlée et deux vis micrométriques permettent un ajustement fin de la séparation des électrodes de mesures.

#### 4.5. Conclusions et Perspectives.

Dans ce chapitre, nous avons présenté un formalisme pour l'analyse de la réponse diélectrique et de la mobilité dynamique de suspensions concentrées de (bio)particules molles

multicouches. En particulier, nous avons déterminé la contribution des propriétés électrohydrodynamiques de chacune des couches perméables dans le contrôle des variations de la permittivité diélectrique et de la mobilité dynamique en fonction de  $\omega$  (voir le §4.3 pour plus d'informations). Ce formalisme se présente comme un guide nécessaire pour l'interprétation de résultats expérimentaux. Ses applications futures sont diverses avec notamment l'étude de l'électrodynamique de (bio)particules telles que les bactéries, les virus ou encore les particules hydrogels. Le travail expérimental effectué dans le cadre de cette thèse a permis la mise au point d'un dispositif et d'un protocole expérimental. Des expériences seront réalisées au sein du laboratoire avec notamment l'analyse de l'électrodynamique de suspensions concentrées de souches bactériennes *Escherichia Coli* K-12. Une seconde application est prévue pour des suspensions de particules virales MS2. En effet, il existe au sein du laboratoire en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie de l'Environnement (LCPME, Nancy) une étude portant sur les propriétés de surface et d'agrégation de bactériophages MS2 en comparaison avec d'autres particules virales synthétisées ne présentant pas de couche ARN interne. Les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques de ces particules en fonction du pH et de la force ionique du milieu de suspension ont déjà été déterminées par électrophorèse (le lecteur peut se référer à la publication de Dika *et al.* [25] pour plus d'informations). Il serait donc judicieux d'évaluer les propriétés électrodynamiques de ces particules en utilisant le dispositif expérimental et en s'aidant du formalisme théorique développé ici.

Finalement, une des motivations de ce travail est la prise en compte de l'électrodynamique d'interphases molles dans les phénomènes de spéciation dynamique. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'acquisition de spectres diélectriques permettait l'analyse du couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques dans des films mous capables de former des complexes avec des cations métalliques présents dans la solution. Une étude en cours porte sur l'évaluation de la dynamique de spéciation métallique dans des suspensions de particules molles complexantes couplée à la dynamique d'interphases molles. Pour se faire, la stratégie employée dans le chapitre 3 (systèmes plans) sera adaptée au cas plus complexe des suspensions de particules molles. Mais à la différence de l'étude précédente où le système ligand ne se déplace pas par rapport à la phase liquide, ce nouveau formalisme devra tenir compte du transfert massique plus complexe des cations métalliques par diffusion, migration mais également par convection sous l'effet du flux électroosmotique

généralisé par le déplacement de la particule par rapport à la phase liquide. Des termes de réaction chimique devront être intégrés dans les équations gouvernant les distributions en ions (ligands, métal libre et métal complexé) et les distributions de potentiel électrostatique en régime statique et dynamique. Nous pouvons anticiper que la taille de la particule contrôlera à la fois la dynamique de complexation et la dynamique de double couche électrique. En effet, une augmentation du rayon de la particule complexante entraîne une spéciation de plus en plus contrôlée par le transport des ions métalliques et une diminution de la fréquence caractéristique associée à l'établissement de la DCE.

### ***Références Bibliographiques.***

1. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle in an oscillating electric field. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1992**, 88 (24), 3567-3581.
2. Ahualli, S.; Delgado, A.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Dynamic Electrophoretic Mobility of Concentrated Dispersions of Spherical Colloidal Particles. On the Consistent Use of the Cell Model. *Langmuir* **2006**, 22 (16), 7041-7051.
3. Arroyo, F. J.; Carrique, F.; Ahualli, S.; Delgado, A. V., Dynamic mobility of concentrated suspensions. Comparison between different calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6 (7), 1446-1452.
4. DeLacey, E. H. B., Dielectric response and conductivity of dilute suspensions of colloidal particles. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1981**, 77 (11), 2007-2039.
5. Mangelsdorf, C. S.; White, L. R., Dielectric response of a dilute suspension of spherical colloidal particles to an oscillating electric field. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* **1997**, 93 (17), 3145-3154.
6. Carrique, F., Dielectric response of concentrated colloidal suspensions. *Journal of Chemical Physics* **2003**, 118 (4), 1945-1956.

7. Bradshaw-Hajek, B. H.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Dynamic Dielectric Response of Concentrated Colloidal Dispersions: Comparison between Theory and Experiment. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1961-1969.
8. Bradshaw-Hajek, B. H.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Frequency-Dependent Electrical Conductivity of Concentrated Dispersions of Spherical Colloidal Particles. *Langmuir* **2008**, *24* (9), 4512-4522.
9. López-García, J. J.; Grosse, C.; Horno, J., Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 2. AC electrokinetic and dielectric properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *265* (2), 341-350.
10. Ohshima, H., Dynamic Electrophoretic Mobility of a Soft Particle. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *233* (1), 142-152.
11. Ahualli, S.; Jiménez, M. L.; Carrique, F.; Delgado, A. V., AC Electrokinetics of Concentrated Suspensions of Soft Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1986-1997.
12. Langlet, J.; Gaboriaud, F.; Gantzer, C.; Duval, J. F. L., Impact of Chemical and Structural Anisotropy on the Electrophoretic Mobility of Spherical Soft Multilayer Particles: The Case of Bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (8), 3293-3312.
13. Duval, J. F. L.; Busscher, H. J.; van de Belt-Gritter, B.; van der Mei, H. C.; Norde, W., Analysis of the Interfacial Properties of Fibrillated and Nonfibrillated Oral Streptococcal Strains from Electrophoretic Mobility and Titration Measurements: Evidence for the Shortcomings of the 'Classical Soft-Particle Approach'. *Langmuir* **2005**, *21* (24), 11268-11282.
14. Kuwabara, S., The forces experienced by randomly distributed parallel circular cylinders or spheres in a viscous flow at small reynolds numbers. *Journal of the Physical Society of Japan* **1959**, *14* (4), 527-532.
15. Duval, J. F. L.; Ohshima, H., Electrophoresis of Diffuse Soft Particles. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3533-3546.
16. Ohshima, H., Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, *62* (2-3), 189-235.

17. O'Brien, R. W.; Jones, A.; Rowlands, W. N., A new formula for the dynamic mobility in a concentrated colloid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *218* (1-3), 89-101.
18. Ahualli, S.; Delgado, A. V.; Miklavcic, S. J.; White, L. R., Use of a cell model for the evaluation of the dynamic mobility of spherical silica suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *309* (2), 342-349.
19. Preston, M. A.; Kornbrekke, R.; White, L. R., Determination of the Dynamic Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle through a Novel Numerical Solution of the Electrokinetic Equations *Langmuir* **2005**, *21* (22), 9832-9842.
20. Kijlstra, J.; Wegh, R. A. J.; van Leeuwen, H. P., Impedance spectroscopy of colloids. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1994**, *366* (1), 37-42.
21. Jiménez, M. L.; Arroyo, F. J.; van Turnhout, J.; Delgado, A. V., Analysis of the Dielectric Permittivity of Suspensions by Means of the Logarithmic Derivative of Its Real Part. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *249* (2), 327-335.
22. Cole, K. S.; Cole, R. H., Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics. *The Journal of Chemical Physics* **1941**, *9* (4), 341-351.
23. Cole, K. S.; Cole, R. H., Dispersion and absorption in dielectrics: II. Direct current characteristics. *The Journal of Chemical Physics* **1942**, *10* (2), 98-105.
24. Havriliak, S.; Negami, S., A complex plane representation of dielectric and mechanical relaxation processes in some polymers. *Polymer* **1967**, *8* (C), 161-210.
25. Dika, C.; Duval, J. F. L.; Ly-Chatain, H. M.; Merlin, C.; Gantzer, C., Impact of Internal RNA on Aggregation and Electrokinetics of Viruses: Comparison between MS2 Phage and Corresponding Virus-Like Particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (14), 4939-4948.



# **Chapitre 5**

**Matériels**

**et**

**Méthodes Expérimentales**



Le travail théorique de cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'ANR Jeune Chercheur PHYSCHEMBACT (2007-2011), porté par Jérôme F. L. Duval : *Physico-chemical determinants of bacterial adhesion* dont l'objectif est d'évaluer les contributions physico-chimiques gouvernant les interactions de bactéries avec leur environnement proche en conditions d'équilibre et/ou en conditions dynamiques.

Le modèle bactérien étudié est de type *Escherichia coli* K12. Les quatre souches isogéniques utilisées, ont été modifiées afin d'exprimer (ou non) à la surface de leur membrane externe des structures moléculaires variées, *i.e. fimbriae, pili* ou adhésine de type antigène 43 (Ag43). L'influence de ces structures sur les propriétés électrostatiques (distribution de charge, hétérogénéité spatiale), hydrodynamiques (perméabilité) et mécaniques (élasticité) de l'interface bactérienne et sur la cinétique d'adhésion des bactéries aux surfaces sera quantifiée dans un régime d'équilibre (dans le cadre de cette thèse) et/ou dans un régime hors-équilibre (dans des travaux futurs).

## **5.1. Présentation de la souche bactérienne *Escherichia coli* K-12.**

### **5.1.1. Structure de l'enveloppe de bactéries Gram négatives [1].**

Les bactéries *Escherichia coli* (ou *E. coli*) sont des bacilles, c'est-à-dire des bactéries en forme de « bâtonnets », de type Gram négatifs (ou Gram -). L'enveloppe de ces bactéries Gram - est constituée de deux membranes (interne et externe) séparées par l'espace périplasmique qui contient une fine couche de peptidoglycanes (voir la Figure 5.1). Cette structure membranaire est à l'origine d'un résultat négatif à la coloration de Gram [2]. Celle-ci consiste à colorer les bactéries en laissant pénétrer une molécule (le cristal violet) à travers la membrane cellulaire jusque dans le cytoplasme au centre de la cellule bactérienne. Suit une étape de décoloration (ou de lavage) à l'alcool où le cristal violet n'est pas retenu par la fine couche de peptidoglycanes (1-3 nm). Les bactéries à Gram - perdent alors leur coloration violette à l'inverse des bactéries à Gram + qui sont protégées par une couche plus dense et plus épaisse de peptidoglycane (20-80 nm). Après une seconde coloration (à la fuchsine ou la safranine), les cellules bactériennes à Gram - prennent une teinte rosée ou rouge les différenciant des bactéries à Gram +.

L'espace interpériplasmique des bactéries Gram – est constitué de protéines qui délivrent des nutriments aux transporteurs\* de la membrane interne. Il contient également des enzymes impliqués dans la synthèse des peptidoglycanes et dans la modification de composés toxiques pouvant endommager la cellule.

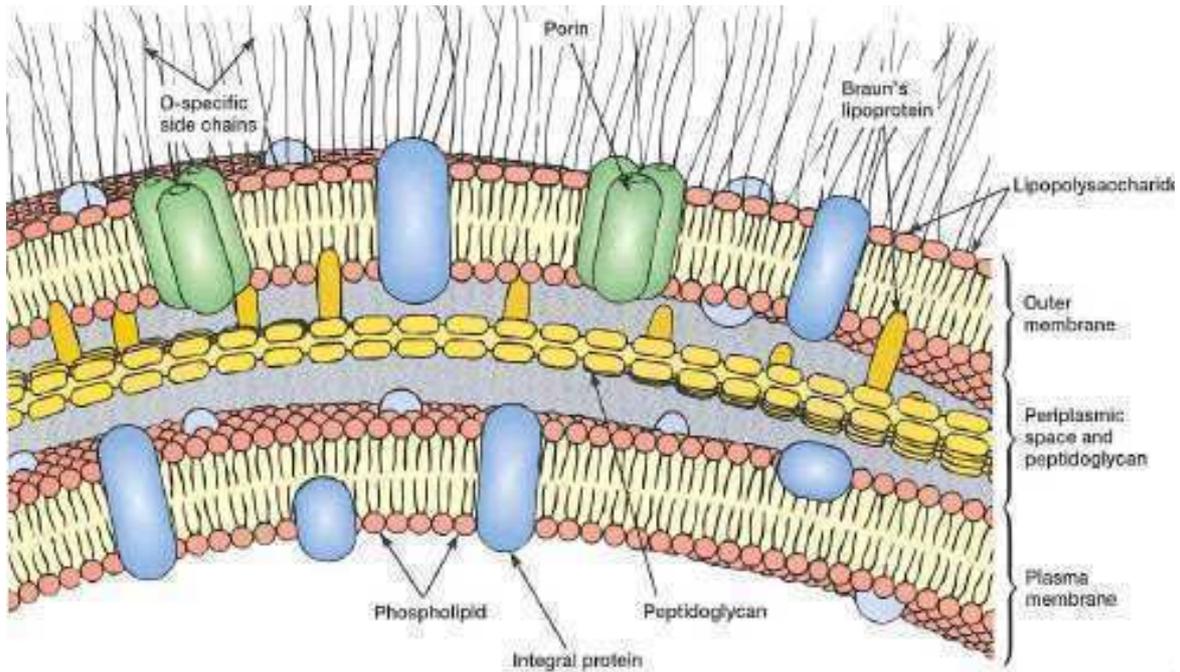
Les membranes cellulaires sont constituées principalement de phospholipides organisés sous la forme d'une bicouche. Leurs têtes hydrophiles sont orientées vers les milieux aqueux intra/extracellulaires et leurs deux queues hydrophobes respectives sont dirigées vers l'intérieur de la bicouche. Une particularité de la membrane externe est la présence de lipopolysaccharides (LPS) faisant face à la couche interne de phospholipides (voir le schéma 5.1). Ceux-ci sont ancrés dans la membrane externe par les lipides A alors qu'une longue chaîne polysaccharidique se retrouve dans le milieu extracellulaire. Les LPS contribuent à la charge négative de l'interface bactérienne et possèdent dans certains cas un pouvoir pathogène car elles peuvent agir comme une endotoxine† et occasionner des symptômes survenant dans les infections de bactéries à Gram – [3]. Une des fonctions les plus importantes de la membrane externe est son rôle de barrière protectrice face à la perte de constituants comme les protéines ou les enzymes périplasmiques, et face à l'entrée d'antibiotiques ou autres substances toxiques pouvant tuer ou endommager la bactérie. La présence de porines autorise la diffusion depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, et *vice-versa*, de petites molécules *e.g* de glucose.

Les bactéries à Gram – sont également capables de synthétiser à la surface de leur membrane externe des structures moléculaires supplémentaires, comme *e.g.* les capsules, et/ou des appendices pouvant mesurer de quelques nanomètres jusqu'à plusieurs micromètres de long comme les flagelles (qui assurent la motricité des cellules), les *pili* ou encore les *fimbriae* (qui interviennent dans le processus de conjugaison bactérienne ou participent à la bio-adhésion). Les rôles de ces deux dernières structures seront détaillés dans la prochaine section.

---

\* Protéine de la membrane interne permettant le passage de petites molécules comme le glucose

† Toxine située dans la membrane externe de nature lipopolysaccharidique



**Figure 5.1.** Illustration de l'enveloppe de cellules bactériennes Gram – (d'après L.M. Prescott et al.[1]).

### 5.1.2. Présentation des quatre souches mutantes *E. coli* analysées en Chapitre 6 et 7 de cette thèse.

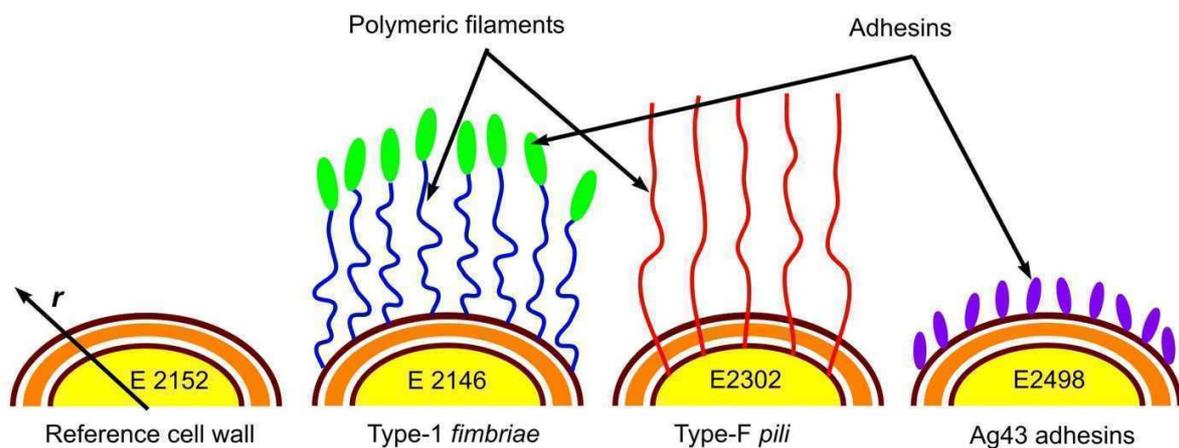
Découverte en 1885 par Théodore Escherich, *E. coli* est une entérobactérie commensale, présente généralement dans la flore gastro-intestinale des mammifères. Caractérisée par un métabolisme anaérobie facultatif, elle est capable de survivre dans un environnement naturel et de se propager dans de nouveaux hôtes. Sous sa forme pathogène, elle est responsable d'infections urinaires et entériques et peut être la cause de maladies nosocomiales. Son génome a par ailleurs été le premier génome bactérien totalement séquencé [4]. De par sa découverte ancienne et sa culture en laboratoire aisée, *E. coli* constitue un des microorganismes les plus connus et étudiés.

Les quatre souches *E. coli* K-12 étudiées ont été génétiquement modifiées par l'Unité de Génétique de Biofilms (UGB) (de l'Institut Pasteur Paris) à partir de la souche mère *E. Coli* MG1655. Les quatre souches ont été modifiées afin d'exprimer naturellement le marqueur GFP (Green Fluorescent Protein), protéine qui manifeste une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée par une lumière bleue ou ultraviolette. De plus, les souches mutantes se différencient par les structures externes qu'elles présentent (ou pas) sur leurs parois

respectives, c'est-à-dire les *fimbriae* de type-1, les *pili* de type-F, et les adhésines Ag43. Ces différentes structures sont illustrées dans la Figure 5.2 et des images obtenues par Microscopie à Force Atomique (mode contact) des quatre souches à l'air sont présentées dans la Figure 5.3 (plus de détails dans le §5.4.2 sur le principe de l'imagerie AFM en mode contact). Les quatre souches étudiées sont :

(i) *La souche E2152*. Dépourvue de structures externes, elle constitue la souche de référence dans nos travaux.

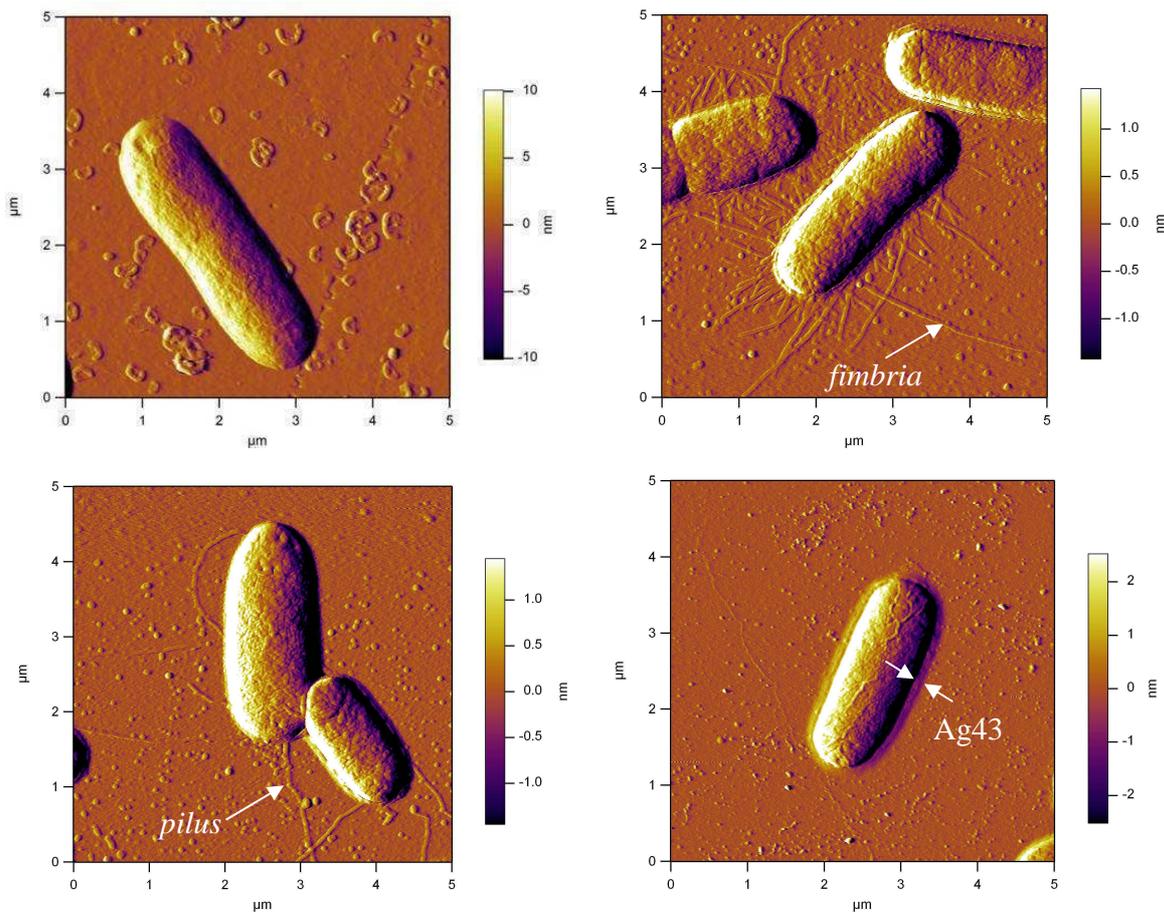
(ii) *La souche E2146*. Cette souche a été génétiquement modifiée afin de surexprimer des *fimbriae* de type-1 qui représente donc la seule structure externe présente sur la paroi bactérienne. Le *fimbriae* de type 1 est un filament constitué de protéines appelées fimbrilines (FIM) ancré dans la membrane externe. Sa structure hélicoïdale atteint des longueurs pouvant varier de 1 à 10  $\mu\text{m}$  pour un diamètre oscillant entre 10 et 20 nm [5]. A l'extrémité se trouve une adhésine spécifique du mannose, FimH assurant l'adhésion sur des cellules hôtes [6]. Ainsi, les *fimbriae* de type 1 peuvent jouer un rôle important dans la formation de biofilms, la pathogénicité et la virulence bactérienne [7].



**Figure 5.2.** Représentation schématique des structures externes de chaque souche *E. Coli* étudiée. (d'après Francius et al.[8]).

(iii) *La souche E2302*. Cette cellule exprime à sa surface essentiellement des *pili* de type F (appelés également *pili* sexuels) associés à la conjugaison bactérienne [9]. Les *pili* de type F ont une structure tubulaire hélicoïdale composée d'une répétition de protéine appelée pilines.

Sa longueur est comprise entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et son diamètre entre 5 à 10 nm [10]. Les *pili* de type F permettent le transfert de matériel génétique de plasmides\* [11] et sont également les récepteurs permettant l'infection de la bactérie par des bactériophages† [12]. De plus, les *pili* de type F sont impliqués dans l'adhésion sur des surfaces abiotiques et dans la maturation des biofilms [13].



**Figure 5.3.** Images de déflexion des souches bactériennes E2152 (A), E2146 (B), E2302 (C) et E2498 (D) dans l'air par Microscopie à Force Atomique en mode contact.

(iv) La souche E2498. Cette dernière souche présente uniquement sur sa paroi des adhésines Ag43 qui sont des protéines rigides et de petite taille (10 nm)[14]. L'antigène 43 (noté Ag43) est une adhésine, c'est-à-dire une protéine de la membrane externe appartenant à

\* Molécules d'ADN distincte de l'ADN chromosomique non essentielle à la survie de la particule

† Virus n'infectant que les bactéries

la famille des auto-transporteurs<sup>\*</sup>. Cette molécule spécifique intervient lors de la fixation des bactéries à un substrat qu'il soit biologique ou abiotique mais également de l'auto-agrégation *via* des processus de reconnaissance biomoléculaire entre les domaines  $\alpha$  des Ag43. Elle est responsable d'infections du tractus urinaires et confère aux bactéries qui en sont porteuses la capacité de « s'auto-agréger » et est exprimée de façon importante durant le mode de vie sous forme de biofilms [15-16].

Ces différentes structures de surface confèrent aux interphases bactériennes des propriétés physico-chimiques (électrostatiques, hydrodynamiques, mécaniques et structurales) variées en termes par exemple de taille et de densité (les bactéries de type E2146 sont recouvertes d'un millier de *fimbriae* alors que seulement 4 à 5 *pili* de type F sont présents à la surface des bactéries E2302 contre plus 60 000 Ag43 pour les bactéries E2498).

### **5.1.3. Cultures bactériennes.**

Les cultures de bactéries ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie de l'Environnement (LCPME, Vandœuvre-lès-Nancy) et ont été encadrées par le Dr. Christophe Merlin. Le protocole pour la culture des quatre souches bactériennes a été établi par les Dr. Christophe Beloin (Institut Pasteur), Dr. Christophe Merlin (LCPME) et moi-même.

#### *5.1.3.1. Préparation des antibiotiques et milieu de culture pour la croissance des bactéries.*

##### Choix des antibiotiques

Pour assurer la sélection de la souche bactérienne étudiée, des antibiotiques sont nécessaires. Les antibiotiques utilisés pour chaque souche bactérienne sont listés dans le tableau 5.1.

---

\* Protéines capables de diriger leur propre transport vers la membrane externe

<b>Souche bactérienne</b>	<b>Antibiotiques</b>
<b>E2152</b>	Amp, Km
<b>E2146</b>	Amp, Km
<b>E2302</b>	Amp, Tet
<b>E2498</b>	Amp, Km

*Tableau 5.1. Antibiotiques utilisés pour la culture de chaque souche bactérienne.*

L'ampicilline (Amp) est utilisée à 100µg/mL finale, c'est-à-dire dans la suspension bactérienne, et est conservée dans une solution d'éthanol (50%) à -20°C. La kanamycine (Km) est utilisée à 50µg/mL final et est conservée dans de l'eau déminéralisée à 4°C. La tetracycline (Tet) est utilisée à 7,5µg/mL final et est conservée dans une solution d'éthanol (50%) à -20°C.

#### Préparation du milieu minimum M63B1

Le milieu utilisé pour la culture en phase liquide des souches bactériennes est le milieu M63B1. Il est considéré comme un milieu minimum (ou pauvre) car il ne comporte que les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance des bactéries. Le protocole pour sa préparation a été élaboré par l'équipe UGB de l'Institut Pasteur. La composition du milieu M63B1 pour 1L final est donnée dans le tableau suivant :

<b>Composé chimique</b>	<b>Quantité (pour 1L final)</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	13,6 g
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%)</b>	10 mL
<b>MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O (10%)</b>	1 mL
<b>FeSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O (1‰)</b>	0,5 mL
<b>Thiamine (0,5‰)</b>	2 mL

*Tableau 5.2. Composition du milieu M63B1 pour 1L final.*

Chaque élément est introduit dans 500 mL d'eau déminéralisée. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) de concentration

10 M. La solution est complétée avec de l'eau déminéralisée pour atteindre un volume total de 1L. Le milieu est finalement autoclavé pendant 20 minutes à 120°C.

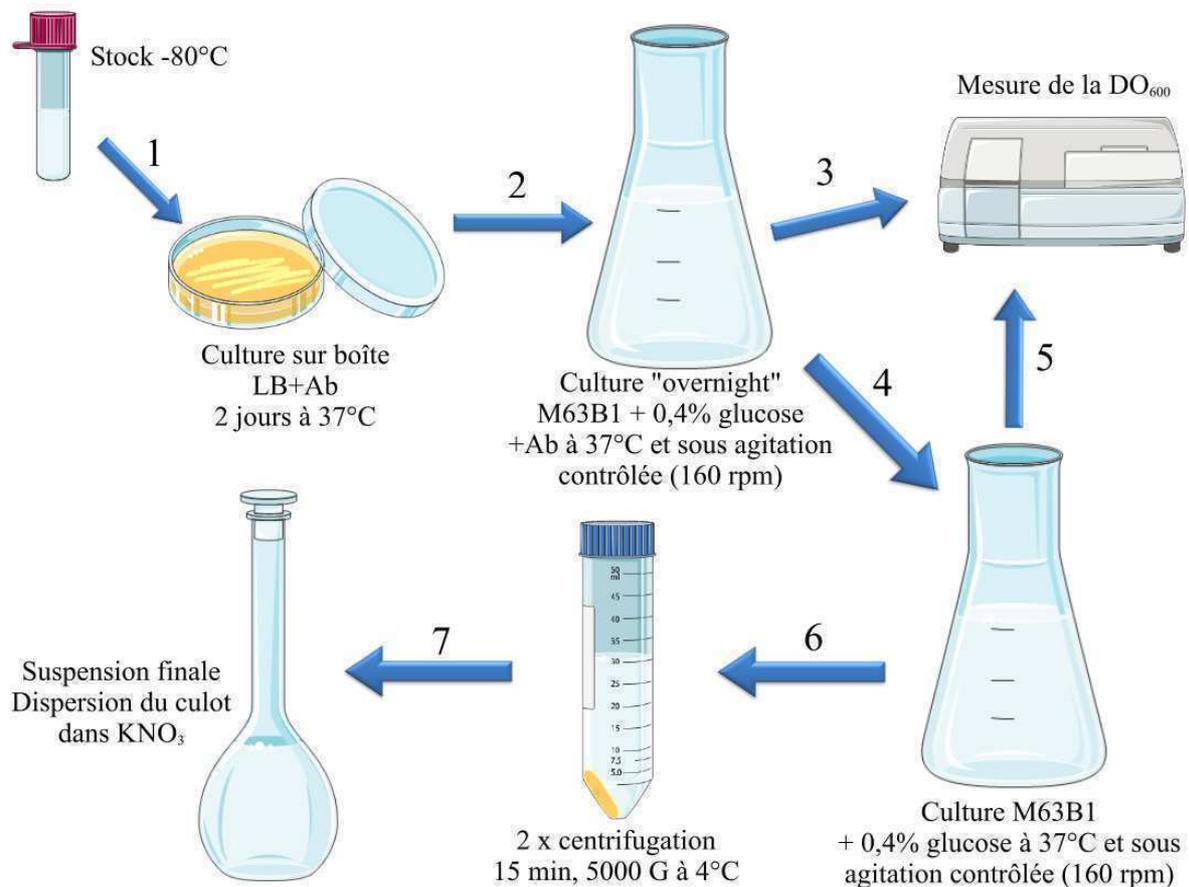
#### 5.1.3.2. *Protocole de culture bactérienne.*

Les différentes étapes de culture bactérienne sont résumées dans la Figure 5.4. Les souches bactériennes sont conservées dans un cryotube à -80°C dans un tampon de stockage contenant 50% d'un tampon bactérien ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0g/L ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 7,0g/L ;  $\text{NaCl}$  – 4,0g/L ;  $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2g/L) et 50% de glycérol (100%).

Les bactéries sont inoculées directement depuis le cryotube dans du milieu LB (Lysogenic Broth) gélosé dans lequel nous avons ajouté les antibiotiques appropriés (étape 1 dans la figure). La boîte de Pétri contenant cet ensemble est placée dans une étuve à 37°C pendant 2 jours. Cette pré-culture sur boîte permet de vérifier visuellement l'absence de contamination et d'avoir accès à des colonies bactériennes isolées.

La veille des manipulations, en fin d'après-midi, une à deux colonies sont prélevées de la culture sur boîte et sont suspendues dans un erlenmeyer contenant le milieu minimum M63B1 complété avec 0,4% de glucose et les antibiotiques appropriés. Le volume de la suspension est fixé à 1/3 de la contenance maximale de l'erlenmeyer afin de conserver une oxygénation de la suspension constante (étape 2 de la figure). L'erlenmeyer est ensuite placé dans un bain thermostaté à 37°C et sous agitation contrôlée (160 rpm) toute la nuit pour une culture dite overnight.

Le lendemain matin (le matin des manipulations), la densité optique de la suspension à 600nm ( $\text{DO}_{600}$ ) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (spectrophotomètre Safas Monaco) (étape 3). Cette quantité est proportionnelle à la concentration en bactéries dans l'échantillon analysé (dans la limite où  $\text{DO}_{600} \leq 1$ ) où une  $\text{DO}_{600}$  de 1 correspond à une concentration en bactéries de  $10^9$  bactéries/mL. Suivant la  $\text{DO}_{600}$  mesurée, un volume adéquat de la culture overnight est introduit dans un erlenmeyer contenant du milieu M63B1 + 0,4% glucose afin d'obtenir une  $\text{DO}_{600} = 0,05$  (étape 4). L'erlenmeyer est placé dans un bain thermostaté à 37°C et sous agitation à 160 rpm pour une dernière culture. Durant cette culture, la croissance de la bactérie est vérifiée en mesurant toutes les 30 minutes la  $\text{DO}_{600}$  du bouillon bactérien (étape 5). Lorsque la suspension atteint une  $\text{DO}_{600}$  d'environ 0,5-0,6, la culture est arrêtée. La croissance de la bactérie est à ce moment en phase exponentielle (pour plus d'informations voir le §5.2).



*Figure 5.4. Protocole de culture bactérienne (détails dans le texte).*

Les bactéries sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation pendant 15 minutes à 5000 G et  $4^{\circ}\text{C}$  (étape 6). Le culot bactérien est ensuite dispersé dans une solution de nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ) de concentration identique à celle du fond ionique de la suspension bactérienne à étudier. La centrifugation est répétée une fois pour obtenir la suspension finale (étape 7).

## 5.2. Suivi de la croissance bactérienne dans des systèmes clos.

Afin d'étudier la croissance des bactéries, les variations de la population totale de cellules bactériennes sont suivies en mesurant la  $\text{DO}_{600}$  de la suspension. Ces variations de population proviennent de la division bactérienne où une bactérie-mère se divise en deux bactéries-filles.

Les bactéries sont cultivées dans un système clos, c'est-à-dire qu'elles sont inoculées et cultivées dans un volume défini de milieu nutritionnel sans ajout de milieu frais au cours de la culture. Par conséquent, au fil de la culture la concentration en nutriments diminue alors que la concentration en déchets toxiques produits par les bactéries augmente.

Une courbe de croissance, qui représente les variations du logarithme de la concentration en bactéries en fonction du temps de culture, peut être divisée en 4 phases successives [1]:

- (i) *Phase de latence* : en général, lorsque les bactéries sont introduites dans le milieu frais, celles-ci ne se divisent pas immédiatement et la quantité de bactéries n'augmente pas ou peu.
- (ii) *Phase exponentielle* : les bactéries se divisent à un taux constant qui dépend du milieu et des conditions de culture. Durant cette phase, la population bactérienne est homogène en termes de propriétés chimiques et physiologiques, c'est pourquoi les souches bactériennes sont généralement étudiées en phase exponentielle.
- (iii) *Phase stationnaire* : la quantité de bactéries vivantes est constante principalement en raison du manque de nutriments disponibles dans le milieu.
- (iv) *Phase de déclin* : la quantité de bactéries vivantes diminue du fait de l'épuisement du milieu en nutriments et de la quantité croissante de déchets toxiques présents dans la culture.

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des souches bactériennes en phase exponentielle. De plus, cette phase nous renseigne sur le temps de génération d'une population bactérienne, c'est-à-dire le temps nécessaire pour doubler la population.

Durant la phase exponentielle, la concentration en bactérie, et par conséquent la  $DO_{600}$  de la suspension, croît exponentiellement avec le temps de culture  $t$  selon  $DO_{600} \propto \exp^{At}$ . Le temps de génération  $t_G$  est donné par  $t_G = \ln 2 / A$ .

### **5.3. Mesure de la mobilité électrophorétique des bactéries par microélectrophorèse.**

La mobilité électrophorétique  $\mu_e$  des quatre souches bactériennes est mesurée en fonction de la concentration en sel du milieu de suspension ( $KNO_3$ ) à l'aide d'une Zetaphorémètre IV (CAD Instrumentation, France). Les données seront ensuite traitées à l'aide d'un formalisme théorique approprié afin d'évaluer les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques des interfaces bactériennes (densité volumique de charge, perméabilité, paramètre d'hétérogénéité de distribution de charge et de matériel membranaire perméable). Le Zetaphorémètre IV utilise la technique de la microélectrophorèse qui consiste à suivre le mouvement des

particules dispersées sous l'application d'un champ électrique constant grâce à la microscopie optique.

Le dispositif expérimental est composé d'une chambre de mesure capillaire en quartz ( $\text{SiO}_2$ ). A ses deux extrémités, sont présentes deux électrodes planes de palladium parfaitement parallèles permettant l'application d'un champ électrique continu (800 V/cm). Cependant, avec un tel dispositif, le mouvement de la particule est le résultat de deux phénomènes électrocinétiques : l'électrophorèse (qui nous intéressent) et l'électro-osmose. Ce dernier donne naissance à un mouvement de fluide le long des parois électriquement chargées suite à l'application d'un champ (voir la Figure 5.5 pour illustration). Le capillaire en quartz se charge négativement au contact d'un milieu aqueux. Une double couche, composée essentiellement de cations se développe à l'interface capillaire/solution. Sous l'action du champ les ions dans la DCE migrent et entraînent avec eux une couche de fluide qui elle-même entraîne une couche de fluide adjacente, couche entraînant elle aussi une couche de fluide voisine. Le capillaire étant fermé à ses extrémités, le fluide s'écoule dans le sens inverse au centre du capillaire. Il existe donc deux plans, appelés plans stationnaires, où la vitesse du fluide, due à l'électro-osmose, est nulle (Figure 5.5). L'électrophorèse est alors le seul phénomène électrocinétique impliqué dans le mouvement des particules. C'est donc au niveau de ces deux plans stationnaires que les mesures de mobilité électrophorétique sont effectuées.

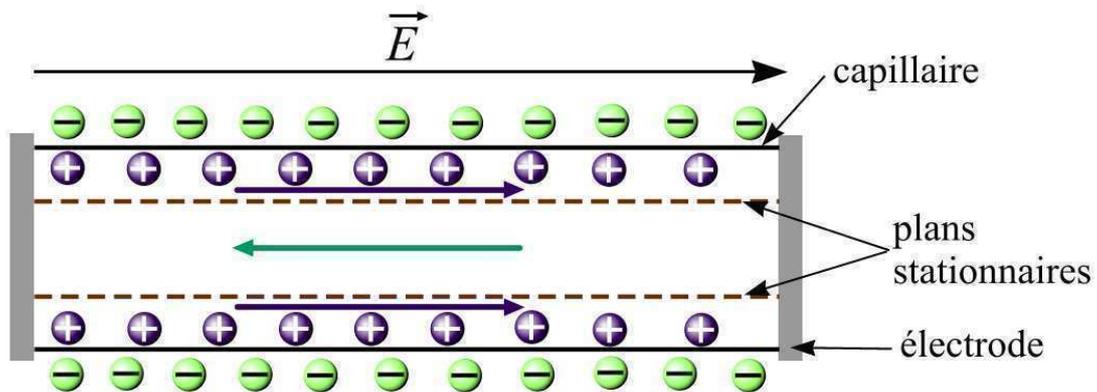


Figure 5.5. Illustration du phénomène d'électro-osmose dans un capillaire.

Les particules sont visualisées à partir de la réflexion d'un faisceau laser. Leurs trajectoires sous l'action du champ sont enregistrées par une caméra CCD (Charge-Coupled Device). La position des particules est repérée à intervalles de temps réguliers. Les mesures sont répétées trois fois de façon à ce que le nombre de trajectoires total dans ces 3 cycles soit

compris entre 80 et 120. A partir de chacune de ces trajectoires, un logiciel (Zetaphoremeter v5, CAD Instrumentation, France) va tout d'abord déterminer la vitesse  $v_e$  de chaque particule puis leur mobilité électrophorétique ( $\mu_e = v_e / E$ ). Le logiciel retourne ensuite les résultats sous la forme d'un diagramme en barre qui représente la répartition des mobilités mesurées. Pour chaque souche bactérienne et quelle que soit la concentration en sel de la suspension, les diagrammes ont toujours manifesté un seul pic indiquant la présence d'une seule population bactérienne. La mobilité électrophorétique de l'ensemble des particules dans la suspension est finalement déterminée en moyennant la totalité des résultats.

Des mesures de mobilité sont effectuées pour les quatre souches bactériennes (E2152, E2146, E2302 et E2498) à 25°C et à pH naturel (environ 6,6). Les bactéries sont dispersées dans 100 mL de solutions de  $\text{KNO}_3$  de différentes concentrations (de 0,5 à 100mM) à  $\text{DO}_{600} = 0,05$  ( $5 \cdot 10^7$  bactéries/mL). La mobilité électrophorétique pour chaque concentration est ensuite mesurée trois fois.

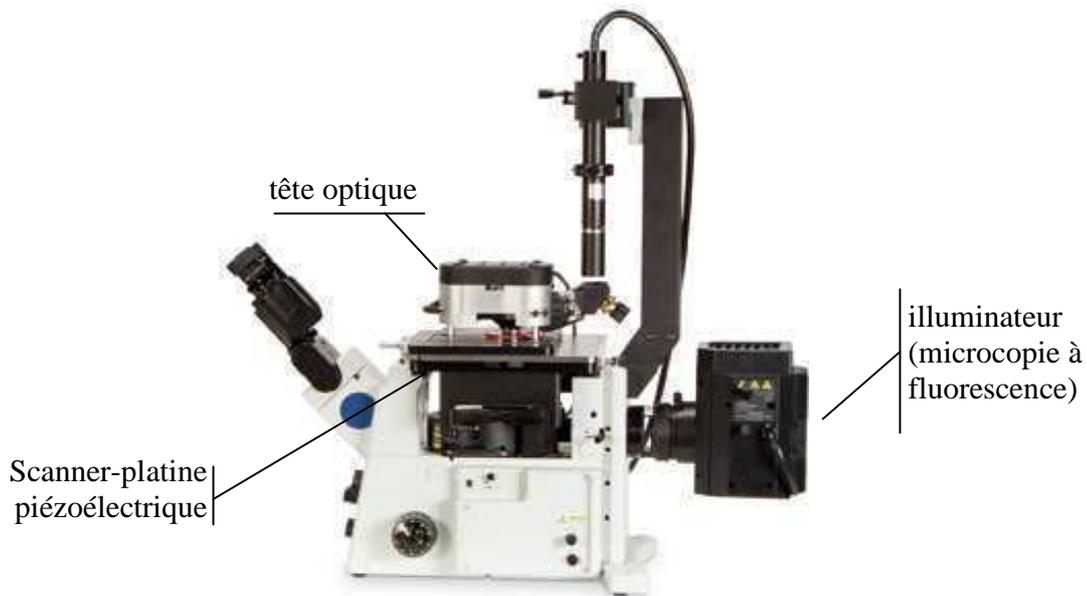
L'expérience est reproduite une à deux fois dans des conditions indépendantes (nouvelles cultures bactériennes, nouveaux fonds ioniques) afin de valider les résultats.

#### **5.4. Microscopie à Force Atomique.**

Développée en 1986, la Microscopie à Force Atomique (AFM – Atomic Force Microscopy) est une microscopie à sonde locale, c'est-à-dire qu'elle consiste à déplacer une sonde (pointe triangulaire en nitrure de silicium ou colloïdale) de dimension nanométrique au voisinage d'une surface à analyser et à mesurer les interactions locales entre la surface et la sonde en fonction du déplacement de cette dernière. L'utilisation de la Microscopie à Effet Tunnel (STM – Scanning Tunneling Microscope), autre microscopie à sonde locale, étant limitée aux matériaux électriquement conducteurs, l'AFM a été développé à partir de la même approche, en vue d'analyser avec la même résolution (résolution atomique) la surface de matériaux conducteurs et isolants comme les polymères ou les surfaces biologiques. L'AFM permet de visualiser la topographie des échantillons et de cartographier les propriétés mécaniques et structurales de ce dernier à l'échelle nanométrique.

Les expériences d'AFM ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie de l'Environnement (LCPME, Villers-lès-Nancy) sous l'encadrement du Dr. Grégory Francius. L'appareil de type MFP3-Bio (Asylum Research Technology, Mannheim,

Allemagne), est constitué d'un microscope inversé Olympus IX71 couplé à un AFM (tête optique qui porte la sonde et le scanner piézoélectrique). Le système fonctionnel de contrôle est constitué d'un ordinateur, d'un boîtier électronique appelé contrôleur et d'une interface Asylum Research couplée au logiciel Igorpro commercialisé par Wavemetric.



*Figure 5.6. Photographie d'un AFM de type MFP3-Bio (Asylum).*

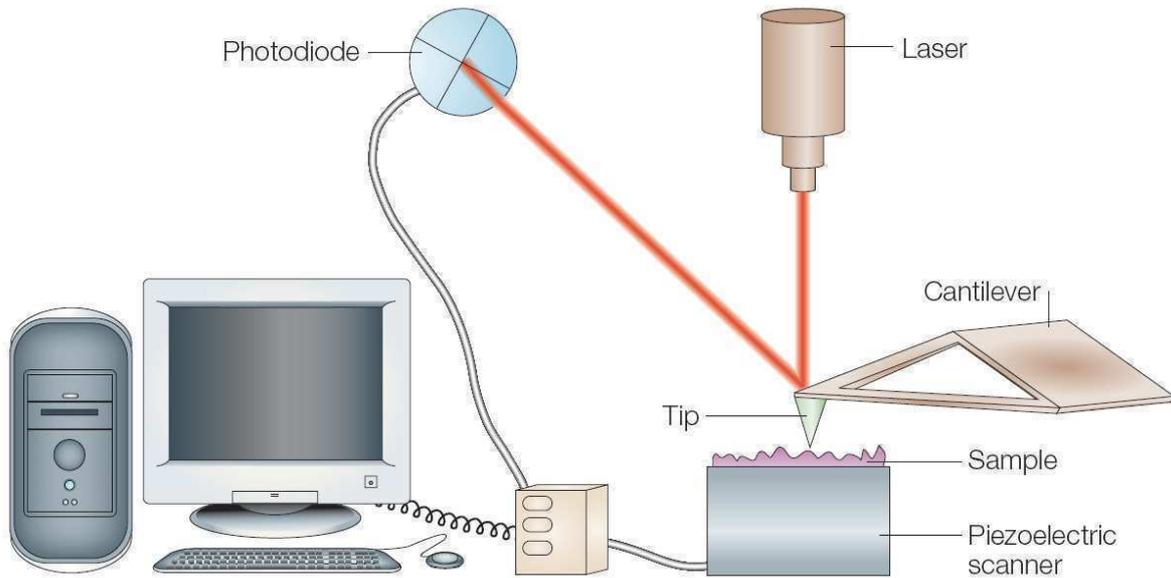
#### 5.4.1. Principe de la Microscopie à Force Atomique.

Le principe de fonctionnement de l'AFM est représenté dans la Figure 5.7. Il repose sur la mesure des interactions entre une pointe AFM de dimension nanométrique et une surface. Cette interaction dépend non seulement de la distance entre la pointe et la surface mais également de leurs propriétés physico-chimiques respectives.

La pointe AFM est fixée à l'extrémité d'un microlevier souple de constante de raideur  $k_C$ . Dans cette étude, nous avons utilisé un ensemble pointe/microlevier MLCT-AUNM en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) de la société Bruker-Nano (Bruker Nano AXS, Palaiseau, France). La pointe utilisée est de forme tétraédrique montée sur un levier triangulaire (voir la Figure 5.8).

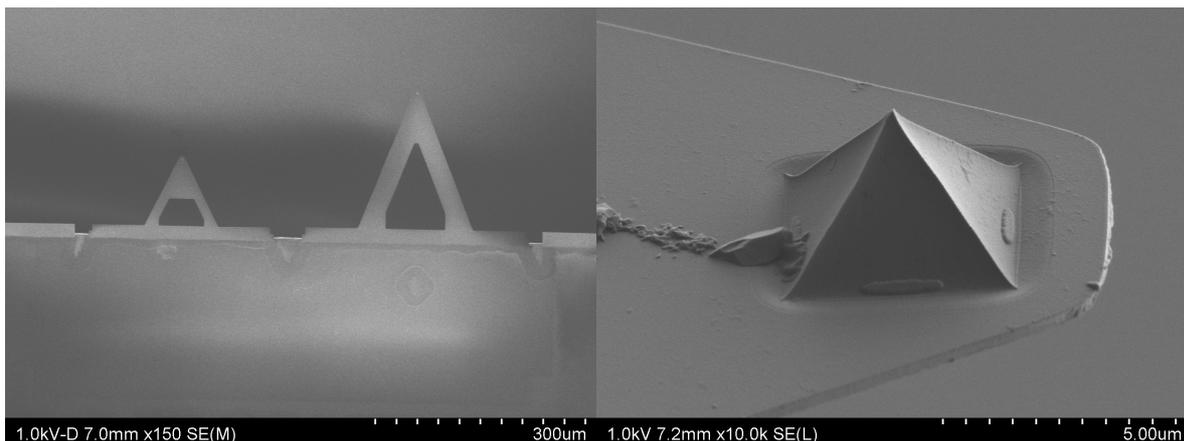
L'échantillon est fixé sur un scanner piézoélectrique qui contrôle son déplacement dans les trois directions de l'espace ( $x, y, z$ ) et donc la distance le séparant de la pointe.

Les interactions entre la pointe et la surface génèrent une déflexion du levier. Cette déflexion est détectée à l'aide d'un système optique. Un laser est focalisé sur l'extrémité du



**Figure 5.7.** Illustration du principe de l'AFM (d'après Dufrêne[17]).

levier et le rayon réfléchi est capté par un photodétecteur à quatre quadrants. La déflexion du levier entraîne une déviation de la trajectoire du rayon réfléchi et une variation de l'intensité reçue par chaque quadrant. Cette intensité et le déplacement de la céramique piézoélectrique sont enregistrés et traités par un logiciel de contrôle pour visualiser la topographie de la surface et acquérir des courbes de forces entre la pointe et la surface analysée.



**Figure 5.8.** Images de Microscopie Electronique à Balayage de microleviers (image de gauche) et pointe (image de droite) MLCT-AUNM. La pointe est fixée à l'extrémité du microlevier.

Avant chaque manipulation, la géométrie de la pointe est vérifiée en utilisant un réseau commercial pour une visualisation 3-D de la pointe (TGT1, NT-MDT Company, Moscow,

Russie). La constante de raideur de chaque microlevier utilisé est ensuite déterminée par la méthode des « fluctuations thermiques » [18]. Cette méthode consiste à mesurer les variations (d'origine thermique) de déflexion du microlevier laissé au repos. La constante de raideur du microlevier  $k_C$  est reliée à l'amplitude de ces variations par l'équation :

$$k_C = c \frac{k_B T}{\langle z^2 \rangle}, \quad (5.1)$$

où  $c$  est une constante propre à la géométrie et au type de microlevier,  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $\langle z^2 \rangle$  la moyenne des carrés des positions du microlevier par rapport à sa position moyenne prise comme référence ( $\langle z \rangle = 0$ ).

#### 5.4.2. Utilisation en mode imagerie.

Il existe trois modes d'imagerie de l'AFM : le mode contact et les modes dynamiques c'est-à-dire les modes non-contact et contact intermittent.

En mode contact, la pointe AFM est placée en contact avec la surface de l'échantillon à analyser. Il est possible de travailler à force constante ou hauteur constante. Le premier cas est le plus utilisé. Il consiste à maintenir constante la déflexion du microlevier et donc la force d'interaction entre la pointe et la surface appliquée. La force d'interaction pointe-surface  $F$  est reliée à la déflexion verticale du microlevier  $\Delta d$  par la loi de Hooke :

$$F = k_C \Delta d. \quad (5.2)$$

Lors du balayage de la surface de l'échantillon, le signal mesuré par le photodétecteur est comparé à un signal de référence. Une boucle de rétroaction ajuste en continu la hauteur de l'échantillon afin d'obtenir une force  $F$  constante. Les déplacements enregistrés du scanner piézoélectrique supportant l'échantillon enregistrés sont ensuite traités pour construire une image en 3-Dimensions de la topographie de la surface. Des images réalisées en mode contact des quatre souches bactériennes étudiées dans l'air sont représentées dans la Figure 5.3.

A hauteur constante, la déflexion verticale du microlevier est mesurée en fonction des déplacements latéraux de l'échantillon. Ce mode est limité aux surfaces à faible rugosité.

L'inconvénient du mode contact est le risque d'une déformation ou dégradation des échantillons composés de polymères ou de matériaux biologiques fragiles. C'est pourquoi deux modes dynamiques, non-contact et contact intermittents, ont été développés.

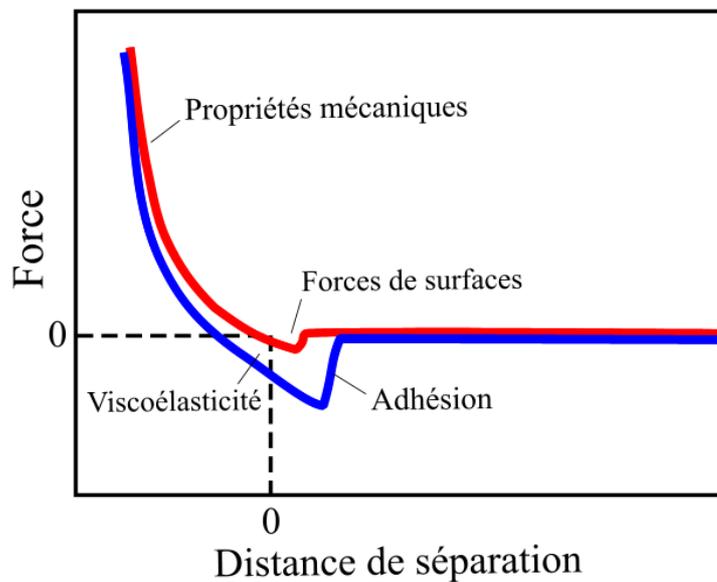
Ces deux modes consistent à faire osciller le microlevier à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. En mode contact intermittent, ou mode « tapping », la pointe rentre en contact avec l'échantillon à chaque oscillation du microlevier. L'interaction entre la pointe et l'échantillon entraîne une variation d'amplitude des oscillations du microlevier. Une boucle de rétroaction ajuste la hauteur de l'échantillon pour maintenir une amplitude constante. Une image de la topographie en 3D de l'échantillon est créée à partir de ses déplacements dans les trois directions de l'espace. En mode non-contact, le microlevier oscille au voisinage de l'échantillon sans jamais entrer en contact avec lui. Les forces pointe-échantillons (plus faibles que dans le mode « tapping ») entraînent une variation d'amplitude des oscillations et une déviation du microlevier. Une boucle de rétroaction va alors s'appliquer pour maintenir constant un de ces deux paramètres. Le mode non-contact est très peu utilisé en raison des faibles interactions mises en jeu entre la pointe et la surface et la nécessité de travailler dans un environnement à faible bruit de fond.

#### 5.4.3. La spectroscopie de force [19].

En tout point de la surface, la déflexion du microlevier est mesurée en fonction du déplacement du scanner piézoélectrique durant son approche et son retrait de la surface à analyser. En utilisant la loi de Hooke, la déflexion du levier est convertie en force d'interaction pointe-échantillon pour obtenir une courbe force-distance ou courbe d'approche-retrait, c'est-à-dire les variations de la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon en fonction de la distance les séparant.

Des courbes typiques d'approche-retrait pouvant être obtenues sur des systèmes bactériens sont représentées dans la Figure 5.9. Lors de l'approche de la céramique vers la pointe AFM, l'échantillon et la pointe vont entrer en interaction. Tout d'abord, avant le contact pointe-échantillon, les interactions *e.g.* électrostatiques et de van der Waals entre les deux protagonistes vont entraîner la déflexion du levier et une variation de la force  $F$  (voir la zone « Forces de surface » dans la Figure). Lorsque le scanner se rapproche de la pointe, l'échantillon et la sonde entrent en contact et les interactions mécaniques interviennent. Deux cas peuvent se présenter. Si l'échantillon est non déformable (constante de raideur très supérieure à  $k_c$ ), l'augmentation de la force  $F$  lorsque la distance de séparation diminue est linéaire et est essentiellement le résultat de la déformation du levier. Si l'échantillon est mou (mollesse mécanique), *e.g.* systèmes polymériques ou microorganismes, la compression et/ou

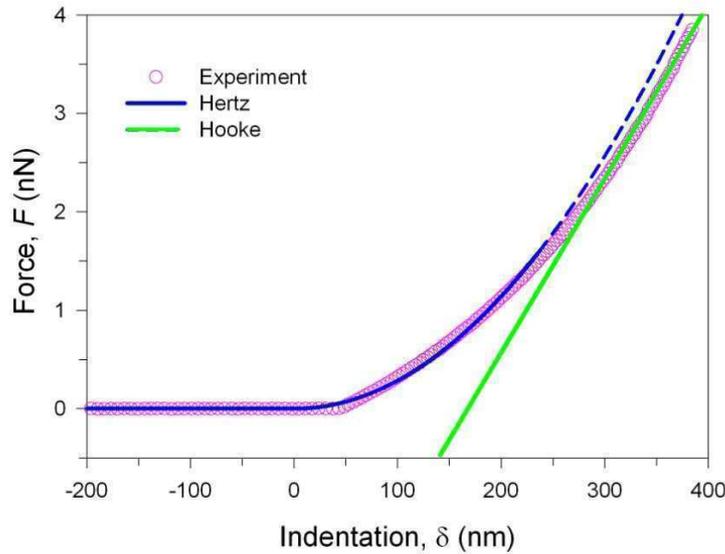
l'indentation de l'échantillon va entraîner des variations linéaires et/ou non-linéaires de  $F$  en fonction de la distance de séparation (voir la Figure 5.9). Nous détaillerons plus tard dans ce paragraphe comment extraire les propriétés mécaniques de l'échantillon, c'est-à-dire l'élasticité et la constante de raideur, à partir des variations de  $F$  en fonction de l'indentation dans ces régimes linéaires et non-linéaires.



**Figure 5.9.** Courbes typiques d'approche (courbe rouge) et de retrait (courbe bleue) obtenues par AFM sur des systèmes mous bactériens. La distance de séparation nulle représente le point de contact entre la pointe et l'échantillon.

Lors de la phase de retrait, si l'échantillon est non déformable et s'il n'y a aucune interaction avec la pointe, la courbe de retrait se superpose à la courbe d'approche. Dans le cas contraire, les disparités entre la courbe de retrait et le courbe d'approche peuvent renseigner sur les propriétés viscoélastiques de l'échantillon et sur les forces d'adhésion agissant entre la pointe et l'échantillon.

Dans ce travail, nous avons étudié exclusivement les courbes d'approche afin de déterminer l'élasticité et la constante de raideur des 4 souches bactériennes. Les courbes d'approche forces-distances sont converties en courbe force-indentation. Un exemple de courbe force-indentation effectuée sur des systèmes bactériens est illustré dans la Figure 5.10.



**Figure 5.10.** Exemple d'une courbe de force-indentation d'un système bactérien dans une solution de concentration 1mM.

L'indentation  $\delta$  correspond à la déformation imposée au matériau, elle est nulle hors contact et augmente lorsque la pointe entre en contact et appuie sur la bactérie. C'est dans cette zone que l'on peut relier la déformation de l'échantillon  $\delta$ , la force d'appui ou force appliquée aux propriétés mécaniques de l'échantillon. Dans le cas des bactéries, cette zone présente un régime de déformation non-linéaire suivi d'un régime de déformation linéaire lorsque la force excède 2 nN.

Le régime non-linéaire correspond au domaine de déformation dominé par les propriétés mécaniques des structures externes de la paroi des bactéries. Leur module d'Young noté  $E$  est déterminé à l'aide du modèle de Sneddon, qui est une adaptation du modèle de Hertz pour la déformation d'un échantillon mou totalement élastique par un cône rigide. L'équation de Sneddon s'écrit :

$$F = \frac{2E \tan(\sigma)}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (5.3)$$

où  $\sigma$  est le demi-angle de la pointe AFM et  $\nu$  est le coefficient de Poisson.

Le régime linéaire de déformation est quant à lui relié à la pression de turgescence (pression osmotique interne) qui contrebalance la pression exercée par la pointe AFM sur le cytoplasme de la bactérie. La pression de turgescence est liée à la constante de raideur de la

bactérie  $k_{\text{cell}}$  [20] qui n'est autre que le coefficient de proportionnalité entre la force  $F$  et la profondeur d'indentation  $\delta$  (loi de Hooke) avec :

$$F = k_{\text{cell}} \delta. \quad (5.4)$$

Si l'AFM est utilisé en mode force-volume, la surface à étudier est alors divisée en une grille de  $N \times N$  pixels. Dans chacun des pixels de la grille, les propriétés mécaniques et/ou adhésives de la surface sondée sont déterminées. L'utilisation de ce mode permet alors de cartographier les propriétés mécaniques et adhésives de la surface, ce qui a été effectué dans le cadre de notre étude.

#### **5.4.4. Préparation des échantillons à analyser.**

Avant d'être analysées par AFM, les bactéries, chargées négativement, sont immobilisées électrostatiquement sur des supports. Pour se faire, les supports (lames de verre borosilicaté), chargées négativement, sont recouvertes d'une monocouche d'un polyélectrolyte cationique : le polyéthylèneimine (PEI). Le PEI de grande masse molaire (750 000 à 1 000 000 g/mol) forme une couche fortement liée à la surface de verre grâce aux fortes interactions électrostatiques entre les deux éléments. La procédure consiste à immerger les lames de verre dans une solution de PEI (0,2%) pendant 30 minutes. Celles-ci sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau Milli-Q puis séchées à l'azote et stockées dans des boîtes de Pétri stériles. Par la suite, 1 mL de culture bactérienne sans antibiotique à  $\text{DO}_{600} = 0,5-0,6$  est déposé sur la lame recouverte de PEI pendant 20 minutes. L'échantillon est alors rincé abondamment trois fois avec de l'eau Milli-Q. L'ensemble lame de verre/PEI/bactéries est ensuite rincé une dernière fois avec 50 mL d'une solution de  $\text{KNO}_3$  de concentration 1 mM. Finalement, la lame est placée dans une cellule liquide d'analyse AFM. Cette dernière possède un réservoir d'environ 2 mL qui permet de couvrir l'échantillon avec une solution de  $\text{KNO}_3$  de concentration d'intérêt (1 mM ou 100 mM).

### **5.5. Adhésion de bactéries sous écoulement contrôlé.**

#### **5.5.1. Cellule d'écoulement.**

Des résultats préliminaires sur les propriétés d'adhésion de la souche bactérienne E2146 (surexpression de *fimbriae* de type I) sous contrainte hydrodynamique contrôlée ont été obtenus. Notre travail a débuté avec la mise en place d'un dispositif expérimental et le

développement d'un protocole associé avec, entre autre, la création d'une chambre d'écoulement à flux convectif tangentiel contrôlé.

L'adhésion de la souche bactérienne E2146 (surexpression de *fimbriae* de type I) sur des coupons de verre est analysée sous une contrainte hydrodynamique contrôlée. L'objectif est de comprendre la cinétique d'adhésion chez *E.coli* sous divers débits d'écoulement et, par conséquent, pour différents nombres de Péclet, associés à des transports bactériens purement diffusifs ( $Pe \ll 1$ ), purement convectifs ( $Pe \gg 1$ ) ou résultant de la balance entre processus de diffusion et de convection ( $Pe$  intermédiaires). Le nombre de Péclet est donné par :

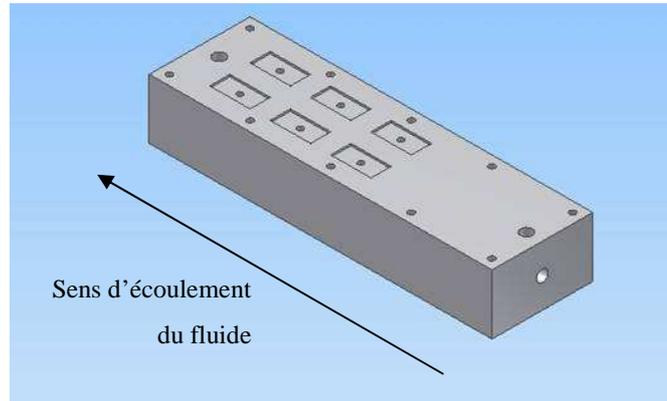
$$Pe = \frac{a_{\text{bact}} u_{\text{flux}}}{D_{\text{bact}}} \quad (5.5)$$

où  $u_{\text{flux}}$  est la vitesse moyenne du flux,  $D_{\text{bact}}$  est le coefficient de diffusion de la bactérie et  $a_{\text{bact}}$  est la taille de la bactérie.

La cinétique d'adhésion ainsi que l'organisation bidimensionnelle des dépôts de bactéries sont quantifiées à l'aide d'un programme informatique sous le logiciel Matlab que nous avons élaboré sous la direction du Dr. Isabelle Bihannic. Ce programme détermine le taux de recouvrement de bactéries sur la surface, la distance entre premiers voisins et les aires et périmètres des bactéries isolées et des agrégats bactériens formés.

Le dispositif expérimental se compose d'une cellule d'écoulement à flux convectif tangentiel contrôlé, dans laquelle les bactéries vont adhérer sur des surfaces de verre, d'une pompe péristaltique, qui contrôle le débit d'écoulement de la suspension bactérienne dans la cellule, et d'un réservoir contenant la suspension bactérienne.

Nous avons créé la cellule d'écoulement à géométrie rectangulaire spécifiquement pour ces expériences. Celle-ci est constituée de deux plaques parallèles en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) séparées par un joint en silicone étanche qui contrôle l'espacement entre les deux plaques où la suspension bactérienne s'écoule (ici 1mm). La plaque inférieure, représentée dans la Figure 5.11, présente deux rangées de trois cavités pouvant contenir des coupons de verre de dimension 20x10x1mm, ainsi qu'une arrivée et une sortie de liquide.



**Figure 5.11.** Représentation de la partie inférieure de la cellule d'écoulement. Les coupons de verre sont placés dans les 6 cavités.

Les coupons de verre sont situés à une distance minimale de 5 cm de l'arrivée de liquide. Cette distance assure l'établissement d'un écoulement stable laminaire de la suspension au niveau des coupons et, par conséquent, des conditions hydrodynamiques identiques pour chaque échantillon [21]. La distance minimale  $Le$  requise pour l'établissement d'un flux laminaire dans une cellule de géométrie rectangulaire est liée au nombre de Reynolds  $Re$  par la relation :

$$Le = \text{constante} \times h_0 \times Re \quad (5.6)$$

avec  $h_0$  la hauteur du canal d'écoulement (1mm). Les valeurs de la constante de proportionnalité peuvent varier entre 0,013 et 0,044, la seconde étant la plus critique. Dans le cas d'une cellule rectangulaire,  $Re$  est donné par

$$Re = \frac{\rho_m Q}{(w_0 + h_0) \eta}, \quad (5.7)$$

où  $\rho_m$  est la densité du fluide,  $Q$  est le débit volumique d'écoulement ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\eta$  la viscosité du milieu et  $w_0$  la largeur du canal. Par conséquent, les dimensions de la chambre d'écoulement assurent l'établissement d'un flux laminaire au niveau des coupons pour des nombres de Reynolds tels que  $Re \leq 1000$  ( $\rho_m = 1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  et  $\eta = 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Cette condition est toujours satisfaite dans cette étude puisque le débit hydrodynamique maximal appliqué ( $Q = 400 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ ) est associé à un nombre de Reynolds  $Re \approx 3 \ll 1000$ .

La géométrie de la cellule ne permet pas une observation en continu de l'adhésion des bactéries sur les surfaces de verre en fonction du temps. Après un temps d'adhésion souhaité,

les lames de verre sont retirées de la cellule pour être observées au microscope à fluorescence inversé. Ce choix a été motivé par le fait que, dans des expériences futures, les forces d'attachement des bactéries sur la surface seront évaluées par AFM qui permet l'évaluation des forces latérales nécessaires au décrochement des bactéries. Le détachement des bactéries est réalisé en appliquant une force latérale croissante entre la pointe AFM et les bactéries jusqu'à ce que celle-ci domine la force d'interaction bactérie-surface et décroche la bactérie adhérente.

Pour suivre la cinétique d'adhésion des bactéries, nous avons fixé différents temps d'expériences (de 5 à 60 minutes) pour 5 débits volumiques (50 ; 100 ; 150 ; 200 et 400 mL/h) associés à des nombres de Reynolds compris entre 0,5 et 3 et des nombres de Péclet compris entre  $10^3$  et  $10^4$ .

### **5.5.2. Protocole expérimental pour l'adhésion de bactéries dans une chambre d'écoulement.**

La cellule d'écoulement contient six coupons de verres. Avant d'être insérés dans la cellule, ceux-ci sont immergés dans une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) 0,1% chauffée à 60°C pendant 30 minutes. Le SDS solubilise et retire les matières organiques présentes à la surface des coupons. Ceux-ci sont ensuite placés dans une solution d'acide chlorhydrique de concentration 0,1M à 60°C pendant 30 minutes. Les coupons sont rincés très abondamment un à un à l'eau milli Q, puis à l'éthanol avant d'être séchés délicatement sous flux d'azote. Finalement ils sont réservés pour des manipulations futures dans du papier KimTech (KimTech Sciences Kimberly Clark) ou directement insérés dans la cellule d'écoulement.

La suspension bactérienne utilisée pour l'adhésion est préparée selon le protocole décrit dans le §5.1.3.2, à la différence que les cultures en milieu liquide sont réalisées dans du milieu LB et qu'une seule centrifugation (5000 G, 15 minutes et 4°C) est effectuée. Le culot bactérien est dispersé dans du milieu M63B1 + 0,4% glucose pour atteindre une  $DO_{600} = 1$ . Ainsi, les bactéries restent en phase exponentielle de croissance pendant la durée de la manipulation.

L'expérience d'adhésion débute en faisant circuler dans la cellule d'écoulement la suspension bactérienne pendant 7 minutes à un débit de 125mL /h. La suspension occupe

alors la totalité de la cellule et chaque coupon est recouvert de suspension bactérienne. La pompe péristaltique est ensuite arrêtée pendant 5 minutes. Cette étape, appelée pause hydrostatique, permet d'amorcer l'adhésion des bactéries sur les plaques de verre. Après cette pause, la circulation de la suspension bactérienne est relancée en augmentant progressivement le débit d'écoulement jusqu'au débit souhaité. L'adhésion des bactéries sur les surfaces de verre sous écoulement contrôlé commence. La pompe péristaltique est arrêtée lorsque le temps d'adhésion souhaité est atteint. Les coupons sont alors rincés en faisant circuler dans la cellule (même débit, durée 8 minutes) le milieu M63B1 + 0,4% glucose afin d'enlever les bactéries non-adhérées sur la surface. La dernière étape consiste à retirer les coupons de la cellule. Durant l'ouverture de la cellule, il est nécessaire de vérifier que les coupons ne sèchent pas. En effet, lors du séchage des plaques de verre, des forces capillaires vont agir sur les bactéries adhérentes et entraîner leur réorganisation sur la plaque. Après avoir placé les coupons dans une boîte de Pétri, nous déposons délicatement sur leur surface environ 1mL d'un tampon phosphate salin (PBS).

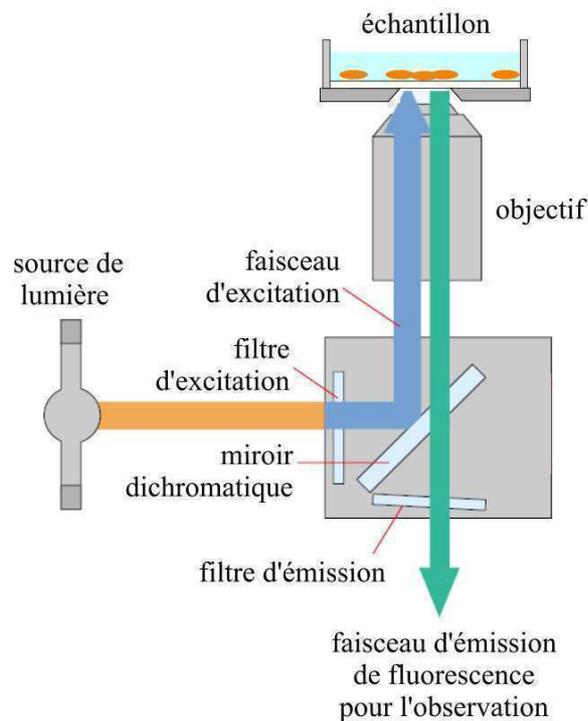
Un des six coupons à analyser est placé dans une cellule pouvant contenir du liquide pour une observation au microscope à fluorescence. Quelques mL de PBS sont finalement déposés sur la surface.

### 5.5.3. Microscopie à Fluorescence.

La distribution spatiale des bactéries sur la surface est observée par microscopie à fluorescence. La bactérie E2146 est naturellement fluorescente car elle exprime le marqueur GFP. Ainsi, lorsque les bactéries sont éclairées par un faisceau lumineux de longueur d'onde  $\lambda = 475\text{nm}$  (lumière bleue), elles émettent par fluorescence une lumière verte de longueur d'onde  $\lambda = 510\text{nm}$ . Le microscope utilisé est le microscope inversé Olympus IX71 couplé à l'AFM (voir la Figure 5.6).

Le principe d'un microscope à fluorescence inversé est représenté dans la Figure 5.12. Une source de lumière, ici une lampe métal halide, émet un faisceau lumineux de couleur blanche (longueurs d'onde comprises entre 350 nm et 700nm). Le faisceau passe à travers un filtre d'excitation qui sélectionne la longueur d'onde d'excitation désirée ( $\lambda = 475\text{nm}$ ). Ce rayon est ensuite réfléchi sur un miroir dichromatique. Après avoir traversé l'objectif (grossissement x20), il éclaire l'échantillon et excite la molécule GFP exprimée par les bactéries. La molécule GFP excitée émet alors un rayonnement fluorescent en retournant à

son état fondamental plus stable. Ce rayonnement, de longueur d'onde  $\lambda = 510\text{nm}$ , passe dans l'objectif et est transmis à travers le miroir dichromatique sans être dévié. Finalement, un dernier filtre, dit d'émission, sélectionne la lumière verte ( $\lambda = 510\text{nm}$ ) et supprime les rayons ultra-violet (qui peuvent abîmer les yeux de l'observateur), violets et bleus restants pour améliorer le contraste de l'image observée. L'image de l'échantillon formée par le microscope peut être directement observée par l'observateur où prise en photographie à l'aide d'un appareil numérique de la marque Olympus.



*Figure 5.12. Principe d'un microscope inversé à fluorescence.*

Au minimum deux des six coupons sont observés au microscope à fluorescence inversé. Pour chaque coupon analysé, des clichés sont enregistrés sur dix emplacements différents.

#### **5.5.4. Traitement des images.**

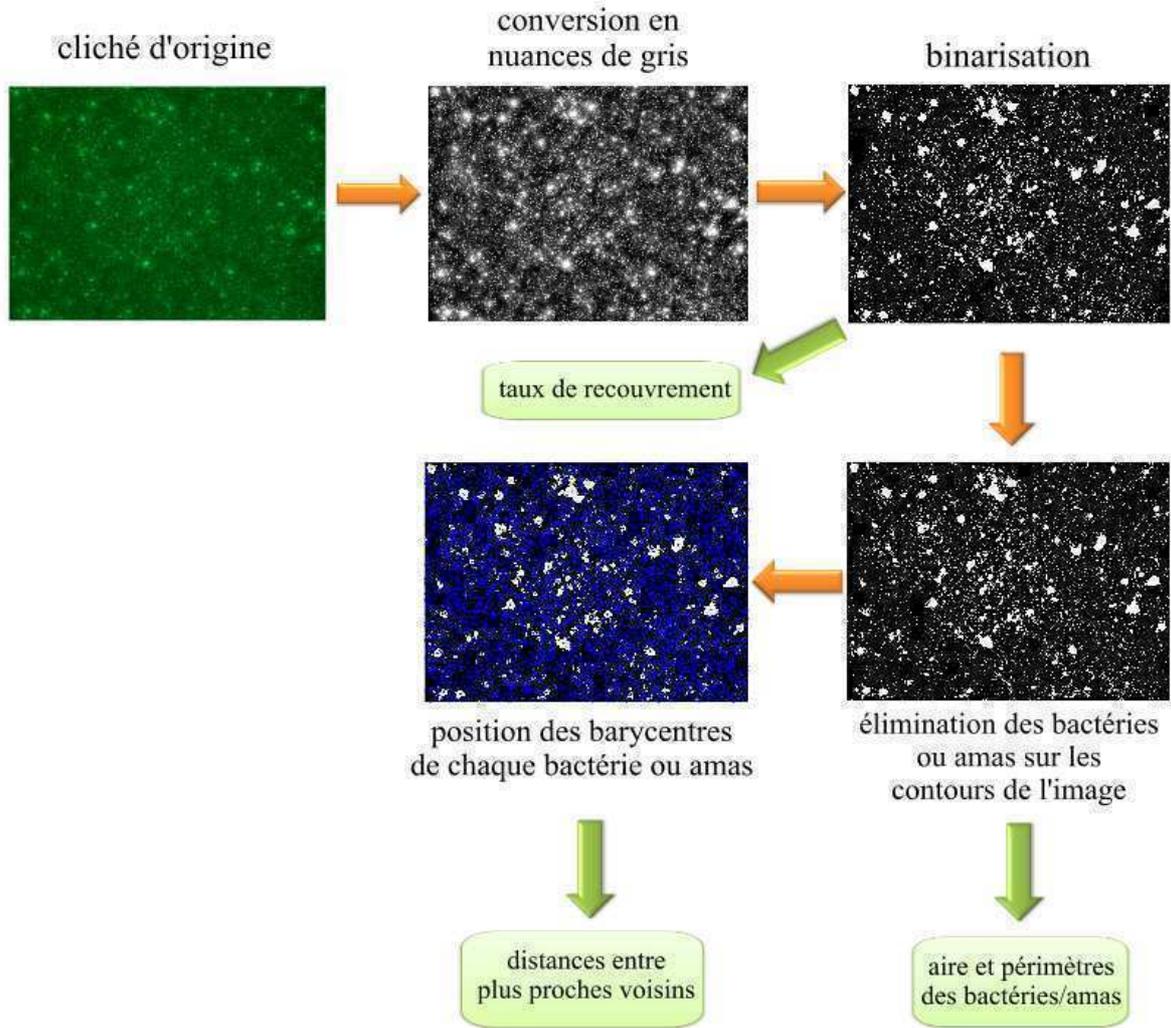
Nous avons développé un programme sous le logiciel Matlab pour déterminer à partir des clichés enregistrés le taux de recouvrement de bactéries sur la surface, la surface et le périmètre de chaque bactérie ou agrégat bactérien formé et la distance entre premiers voisins.

Les différentes étapes pour l'analyse des images sont représentées dans la Figure 5.13. Premièrement, l'image d'origine est convertie en nuance de gris. Chaque pixel de l'image est

associé à un nombre compris entre 0 (couleur noire) et 1 (couleur blanche) qui détermine son niveau de gris. Cette image est ensuite binarisée, c'est-à-dire transformée en une image en noir ou blanc (0 ou 1) où un pixel de couleur blanche représente le système bactérien et un pixel de couleur noire correspond à la surface. Pour cela, un niveau de gris seuil, automatiquement déterminé par le programme ou choisi par l'opérateur, représente la frontière qui détermine si un pixel correspond au système bactérien ou au coupon de verre. A partir de cette image binaire, le taux de recouvrement  $\theta$  de la surface par les bactéries est calculé en faisant la somme des pixels blanc (bactéries) sur la somme totale des pixels.

Pour déterminer le périmètre et l'aire des amas bactériens, les amas ou bactéries coupés par le contour de l'image sont supprimés. Nous avons utilisé une des fonctions de matlab (« *regionprops* ») pour le calcul des aires et des périmètres.

Finalement, le programme détermine la position du barycentre de chaque bactérie ou amas et calcule la distance les séparant. Le programme sélectionne et retourne la distance minimale pour chaque amas qui représente la distance le séparant de son plus proche voisin.



*Figure 5.13. Cheminement des différentes étapes de l'algorithme développé sous matlab pour le traitement des clichés de bactéries adhérees sur un coupon de verre.*

**Références Bibliographiques.**

1. Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A., *Microbiology*. Wm. C. Brown Publishers. 3rd ed.: 1996.
2. Beveridge, T. J.; Davies, J. A., Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. *Journal of Bacteriology* **1983**, *156* (2), 846-858.
3. Krapf, M. E. M.; Lartiges, B. S.; Merlin, C.; Francius, G.; Ghanbaja, J.; Duval, J. F. L., Polyethyleneimine-mediated flocculation of *Shewanella oneidensis* MR-1: Impacts of cell surface appendage and polymer concentration. *Water Res.* **2012**, *46* (6), 1838-1846.
4. Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y., The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277* (5331), 1453-1462.
5. Hahn, E.; Wild, P.; Hermanns, U.; Sebbel, P.; Glockshuber, R.; Häner, M.; Taschner, N.; Burkhard, P.; Aebi, U.; Müller, S. A., Exploring the 3D Molecular Architecture of *Escherichia coli* Type 1 Pili. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *323* (5), 845-857.
6. Klemm, P.; Christiansen, G., Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular and General Genetics MGG* **1987**, *208* (3), 439-445.
7. Wiles, T. J.; Kulesus, R. R.; Mulvey, M. A., Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* **2008**, *85* (1), 11-19.
8. Francius, G.; Polyakov, P.; Merlin, J.; Abe, Y.; Ghigo, J.-M.; Merlin, C.; Beloin, C.; Duval, J. F. L., Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS ONE* **2011**, *6* (5), e20066.
9. Reisner, A.; Haagenen, J. A. J.; Schembri, M. A.; Zechner, E. L.; Molin, S., Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology* **2003**, *48* (4), 933-946.
10. Wang, Y. A.; Yu, X.; Silverman, P. M.; Harris, R. L.; Egelman, E. H., The Structure of F-Pili. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *385* (1), 22-29.

11. Dionisio, F.; Matic, I.; Radman, M.; Rodrigues, O. R.; Taddei, F., Plasmids Spread Very Fast in Heterogeneous Bacterial Communities. *Genetics* **2002**, *162* (4), 1525-1532.
12. Jacobson, A., Role of F Pili in the Penetration of Bacteriophage  $\phi$ . *Journal of Virology* **1972**, *10* (4), 835-843.
13. Ghigo, J.-M., Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **2001**, *412* (6845), 442-445.
14. Caffrey, P.; Owen, P., Purification and N-terminal sequence of the alpha subunit of antigen 43, a unique protein complex associated with the outer membrane of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **1989**, *171* (7), 3634-3640.
15. Anderson, G. G.; Palermo, J. J.; Schilling, J. D.; Roth, R.; Heuser, J.; Hultgren, S. J., Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections. *Science* **2003**, *301* (5629), 105-107.
16. Ulett, G. C.; Valle, J.; Beloin, C.; Sherlock, O.; Ghigo, J.-M.; Schembri, M. A., Functional Analysis of Antigen 43 in Uropathogenic Escherichia coli Reveals a Role in Long-Term Persistence in the Urinary Tract. *Infection and Immunity* **2007**, *75* (7), 3233-3244.
17. Dufrière, Y. F., Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2* (6), 451-460.
18. Vadillo-Rodríguez, V.; Busscher, H. J.; Norde, W.; de Vries, J.; Dijkstra, R. J. B.; Stokroos, I.; van der Mei, H. C., Comparison of Atomic Force Microscopy Interaction Forces between Bacteria and Silicon Nitride Substrata for Three Commonly Used Immobilization Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (9), 5441-5446.
19. Dupres, V.; Menozzi, F. D.; Loch, C.; Clare, B. H.; Abbott, N. L.; Cuenot, S.; Bompard, C.; Raze, D.; Dufrière, Y. F., Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nature Methods* **2005**, *2* (7), 515-520.
20. Arnoldi, M.; Fritz, M.; Bäuerlein, E.; Radmacher, M.; Sackmann, E.; Boulbitch, A., Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Physical Review E* **2000**, *62* (1), 1034-1044.
21. Busscher, H. J.; van der Mei, H. C., Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clinical Microbiology Reviews* **2006**, *19* (1), 127-141.





## **Chapitre 6**

# **Impact des Structures de Surfaces de Bactéries *Escherichia Coli* sur leurs Propriétés Mécaniques et Électro-hydrodynamiques**

Francius, G.; Polyakov, P.; Merlin, J.; Abe, Y.; Ghigo, J.-M.; Merlin, C.; Beloin, C.; Duval, J. F. L.,  
Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of  
*Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS ONE* **2011**, *6* (5), e20066.



La réactivité des bactéries dans leur environnement est essentiellement déterminée par les propriétés physico-chimiques et biochimiques de l'interphase bactérienne (*i.e.* de enveloppe bactérienne) qui sépare les bactéries du milieu externe. Pour de nombreux systèmes bactériens, la membrane externe est recouverte par des structures de surface telles que les *pili*, les *fimbriae*, les exopolysaccharides ou les flagelles. Chaque structure possède des propriétés physico-chimiques différentes (électrostatiques, hydrodynamiques, mécaniques) et peut s'étendre sur quelques nanomètres (Ag43) jusqu'à quelques microns (*fimbriae*, *pili*) depuis la membrane externe vers le milieu externe. Ces structures sont impliquées dans de nombreux processus d'interface physiques et biologiques, *e.g.* le transfert de plasmides par conjugaison, l'adhésion sur des surfaces biotiques/abiotiques, les interactions entre bactéries, la formation de biofilms, la motilité\* ou encore la pathogénicité. Pendant la croissance et la division cellulaire ou en réponse à un stress osmotique, l'enveloppe bactérienne subit des contraintes morphologiques qui peuvent affecter l'intégrité de la bactérie. Afin que l'enveloppe bactérienne neutralise la pression interne de turgescence, il est nécessaire que ses propriétés mécaniques reflètent le comportement d'une matière à la fois rigide et malléable. Des études précédentes ont démontré que les propriétés mécaniques des bactéries changent significativement en réponse à des forces agissant sur leur structure comme lors de la croissance et la division bactérienne ou pendant les processus d'adhésion et d'infection. Ayant connaissance de ces éléments, il est clair qu'une compréhension de la réactivité de cellules bactériennes requiert des mesures et des interprétations précises des propriétés mécaniques de l'ensemble de l'enveloppe bactérienne composée de la membrane externe et des structures de surface.

La Microscopie à Force Atomique (AFM) a émergé comme une technique de choix pour comprendre les propriétés mécaniques des microorganismes à l'échelle nanométrique. Un de ses avantages majeurs est qu'elle permet l'étude des structures de surface dans un milieu aqueux de composition contrôlée. Ceci la rend idéale pour analyser l'enveloppe bactérienne en réponse à un stress osmotique. Bien que l'enveloppe et les structures de surfaces de bactéries Gram – soient précisément identifiées, les études AFM des propriétés mécaniques de cellules vivantes dans un milieu aqueux en fonction de la force ionique du milieu restent rares. En particulier, l'analyse des contributions respectives des structures de surfaces dans le

---

\* Capacité d'une cellule vivante à se déplacer en consommant de l'énergie.

contrôle de l'élasticité de l'enveloppe bactérienne et de la pression de turgescence reste à explorer. De plus l'impact de la réorganisation de ces structures, suite à un stress osmotique, sur les propriétés mécaniques de l'enveloppe bactérienne ne fait l'objet d'aucune étude précise malgré son rôle dans les phénomènes gouvernant la réactivité des bactéries dans un environnement hypotonique/hypertonique<sup>†</sup>.

Dans ce chapitre présenté sous la forme d'une publication, nous nous intéressons à l'étude des propriétés mécaniques de quatre mutants *E.coli* K-12 (décrits dans le Chapitre 5 §5.1.2) en fonction de la force ionique du milieu. Pour rappel, les quatre souches *E.coli* ont été modifiées de manière à ce qu'elles expriment sélectivement (ou non) sur leur membrane externe des structures de surfaces (*fimbriae* de type-1, *pili* de type-F, adhésines Ag43).

L'analyse des courbes de force-indentation permet d'extraire le module d'Young et la pression de turgescence des bactéries en fonction de la force ionique du milieu (1-100mM). Les courbes obtenues permettent également d'évaluer les changements morphologiques de l'enveloppe bactérienne dans des conditions de stress hypertonique. Des mesures électrocinétiques par microélectrophorèse complètent l'étude AFM. Les données expérimentales sont analysées à l'aide d'un formalisme théorique développé pour la détermination de la mobilité électrophorétique de particules molles hétérogènes en forme de bâtonnet. Les propriétés électrostatiques et hydrodynamiques (densité de charge et perméabilité hydrodynamique des appendices de surfaces et de la membrane externe, capacité à gonfler sous une diminution de la force ionique) sont déterminées. Ce couplage analyse AFM/analyse électrocinétique permet de déterminer les relations entre la nature des structures composant l'enveloppe bactérienne et leurs propriétés électro-hydrodynamiques (densité de charge, perméabilité, gonflement) et mécaniques (élasticité/rigidité).

**Note : Dans la publication, la Figure 4 a été remplacée par erreur par la Figure 3. Nous avons donc ajouté la vraie Figure 4 à la fin de l'article (avant les Supporting Informations).**

---

<sup>†</sup> Environnement ayant une concentration en sel inférieure (hypotonique) / supérieure (hypertonique) par rapport à la concentration en sel dans le cytoplasme de la cellule

# Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress

Grégory Francius<sup>1\*</sup>, Pavel Polyakov<sup>1</sup>, Jenny Merlin<sup>2</sup>, Yumiko Abe<sup>1</sup>, Jean-Marc Ghigo<sup>3,4</sup>, Christophe Merlin<sup>1</sup>, Christophe Beloin<sup>3,4</sup>, Jérôme F. L. Duval<sup>2\*</sup>

**1** Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy Université, CNRS UMR7564, Villers-lès-Nancy, France, **2** Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy Université, CNRS UMR7569, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **3** Institut Pasteur, Unité de Génétique des Biofilms, Paris, France, **4** CNRS URA 2172, Paris, France

## Abstract

The physicochemical properties and dynamics of bacterial envelope, play a major role in bacterial activity. In this study, the morphological, nanomechanical and electrohydrodynamic properties of *Escherichia coli* K-12 mutant cells were thoroughly investigated as a function of bulk medium ionic strength using atomic force microscopy (AFM) and electrokinetics (electrophoresis). Bacteria were differing according to genetic alterations controlling the production of different surface appendages (short and rigid Ag43 adhesins, longer and more flexible type 1 *fimbriae* and *F pilus*). From the analysis of the spatially resolved force curves, it is shown that cells elasticity and turgor pressure are not only depending on bulk salt concentration but also on the presence/absence and nature of surface appendage. In 1 mM KNO<sub>3</sub>, cells without appendages or cells surrounded by Ag43 exhibit large Young moduli and turgor pressures (~700–900 kPa and ~100–300 kPa respectively). Under similar ionic strength condition, a dramatic ~50% to ~70% decrease of these nanomechanical parameters was evidenced for cells with appendages. Qualitatively, such dependence of nanomechanical behavior on surface organization remains when increasing medium salt content to 100 mM, even though, quantitatively, differences are marked to a much smaller extent. Additionally, for a given surface appendage, the magnitude of the nanomechanical parameters decreases significantly when increasing bulk salt concentration. This effect is ascribed to a bacterial exosmotic water loss resulting in a combined contraction of bacterial cytoplasm together with an electrostatically-driven shrinkage of the surface appendages. The former process is demonstrated upon AFM analysis, while the latter, inaccessible upon AFM imaging, is inferred from electrophoretic data interpreted according to advanced soft particle electrokinetic theory. Altogether, AFM and electrokinetic results clearly demonstrate the intimate relationship between structure/flexibility and charge of bacterial envelope and propensity of bacterium and surface appendages to contract under hypertonic conditions.

**Citation:** Francius G, Polyakov P, Merlin J, Abe Y, Ghigo J-M, et al. (2011) Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. PLoS ONE 6(5): e20066. doi:10.1371/journal.pone.0020066

**Editor:** Igor Sokolov, Clarkson University, United States of America

**Received:** January 7, 2011; **Accepted:** April 17, 2011; **Published:** May 31, 2011

**Copyright:** © 2011 Francius et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was financially supported by the French program ANR-07-JCJC-0024-01 PHYSCHEMBACT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: gregory.francius@cpme.cnrs-nancy.fr (GF); jerome.duval@ensg.inpl-nancy.fr (JFLD)

## Introduction

The reactivity of bacteria with respect to their close environment is largely connected to biochemical and physicochemical properties defining the microorganism interphase, *i.e.* the cell wall, that spatially separates the bacteria from the outer medium [1]. For gram-negative bacteria, the cell wall consists of an outer membrane, which contains lipopolysaccharides (LPS) and surrounds a gel-like periplasm with a thin peptidoglycan layer [1,2,3,4]. These cell wall components are separated from the cytoplasm by the inner membrane predominantly composed of phospholipids with embedded proteins. Despite their deceptively simple organization, gram-negative nude cell wall are involved in a vast array of complex cellular processes that serve key biological functions, *e.g.* ion channel conductance [5], cell signaling [6], cell growth or cell division [4,7]. Additionally, these constituents are known to be essential in maintaining cellular shape [4] and in resisting internal Turgor pressure. For numerous bacterial systems,

the cell wall is further decorated by surface layer organizations of the type *pili*, *fimbriae*, *curli*, exopolysaccharides (EPS) or flagella. These so-called surface appendages may protrude several hundreds of nanometers from the anchoring cell wall. It is now well-reported that such bacterial surface ultrastructures are involved in numerous physical and biological interfacial processes, *e.g.* plasmid transfer through conjugation [8], adherence to materials or host cell surfaces [9], cell-cell interactions [10], biofilm formation [11,12,13,14,15], motility [16,17,18] and pathogenicity [19,20,21].

In the course of cellular growth and division, or in response to osmotic changes within the neighboring environment, cell wall undergoes morphological constraints affecting in some cases their integrity. For cell walls to appropriately counteract the inner Turgor pressure and allow efficient bacterial growth and division, it is necessary that their mechanical properties reflect the behavior of both stiff and ductile materials. Previous work demonstrated that mechanical properties of bacteria, including cell wall elasticity,

change significantly as a result of forces acting on bacterial structure as it is the case during cell growth and division [22,23], or during adhesion and infection processes [9,24,25]. In view of these elements, a fundamental comprehension of the physiological processes and reactivity of bacterial cells necessarily requires, besides the underlying details on gene expression [26,27,28], accurate measurement and interpretation of their mechanical properties [22,29,30,31,32] in relation with envelope structure that includes not only cell wall but also surface appendages.

In the past decades, much progress has been made in understanding the mechanical and more generally the physico-chemical properties of microorganisms [33,34]. However, due to the small size of the cells, these properties remain difficult to address at a nanometric level. In this context, atomic force microscopy (AFM) has emerged as a valuable and powerful tool [35] for studying nanomechanical characteristics of living cells [36,37,38]. Other practical applications of AFM includes the imaging of cell ultrastructures such as *pili*, *fimbriae* [14,39,40] or the elucidation of the impact of antibacterial molecules [38,41,42] on genetically modified bacteria [37,43]. A major advantage of AFM is that it allows measurements of surface nanostructure in aqueous media of controlled composition, which makes it ideal for analyzing cell wall response to osmotic stress. Although the structure and possible chemical make-up of Gram-negative cell wall may be now accurately identified, AFM studies on mechanical properties of individual living cells in aqueous medium as a function of salt concentration remain scarce. In particular, unraveling the respective contribution of long or short external structures in governing bacterial envelope elasticity, Turgor pressure and stretching modulus (*i.e.* bacterial surface tension) remain an issue. Also, the impact of cell wall ultrastructure reorganization following swelling/stretching processes on nanomechanical properties of the bacterial envelope as a whole, has deserved too little attention despite the fundamental importance of these phenomena in governing bacterial reactivity under hypotonic/hypertonic stress conditions.

In this study, we report a systematic investigation of the ionic strength dependent-nanomechanical properties of *E. coli* K-12 mutant strains which selectively express (or not) surface appendages such as type 1 *fimbriae*, F conjugative *pilus* or autotransported adhesin antigen 43, known to be involved in biofilm formation and/or bacterial pathogenicity [15,20,44,45,46,47,48] (see Materials & Methods for a full description of these surface structures). Analysis of the AFM force-indentation curves yields the Young moduli, internal Turgor pressures and stretching moduli of the bacteria of interest as a function of medium ionic strength. It further allows evaluating not only how nanomechanics is impacted by envelope structure but also addressing the changes operated on this structure in hypertonic stress conditions. The AFM study is complemented by electrokinetic measurements which, upon modeling on the basis of theory for permeable (soft) bioparticles, highlight the relation existing between density of charges carried by the surface appendage, its propensity to swell upon lowering medium salt content and its intrinsic elasticity/rigidity as determined independently by AFM. Overall, this work quantitatively underlines the intertwined relationships between nature of bacterial envelope structure, their dynamic features (swelling), and physico-chemical properties expressed in terms of nanomechanical, electrostatic and hydrodynamic (permeability) characteristics.

## Materials and Methods

### Bacterial strains

The *E. coli* K-12 strains used in this study are listed in **Table 1** and **Table 2** where relevant information on their respective

construction, antibiotic resistance, genotype and surface appendages expression can be found. These isogenic strains were constructed from *Escherichia coli* MG1655 (*E. coli* genetic stock center CGSC#6300) by transformation and  $\lambda$  red linear DNA gene inactivation method using the pKOBEG plasmid [49,50], followed by P1vir transduction into a fresh *E. coli* background when possible. Alternatively, strains were constructed by P1vir transduction of previously constructed and characterized mutation or insertion. All strains used in this study contain the *gfpmut3* gene linked to the *bla* ampicillin resistance gene (*amp<sup>R</sup>*, 100  $\mu$ g/ml) that makes them fluorescent, and a deletion of the *fliE* to *fliR* genes replaced by the *cat* chloramphenicol resistance gene (*cm<sup>R</sup>*, 25  $\mu$ g/ml), which ensures the absence of flagella. Absence of flagella was verified by absence of motility using motility assay on low agar motility plates (data not shown). Our reference strain (E2152) has been constructed by creation and P1vir transduction of mutations previously shown to i/abolish type 1 *fimbriae* production (deletion of the type 1 *fimbriae* encoding operon,  $\Delta$ *fimA-H: zeo, zeo<sup>R</sup>* 50  $\mu$ g/ml), or ii/abolish adhesin Ag43 production (deletion of the *flu* gene,  $\Delta$ *flu: km, km<sup>R</sup>* 100  $\mu$ g/ml or  $\Delta$ *flu: zeo, zeo<sup>R</sup>* 50  $\mu$ g/ml). Primers used to construct the  $\Delta$ *fliE-R: cat*,  $\Delta$ *flu: km*,  $\Delta$ *flu: zeo* and the  $\Delta$ *fimA-H: zeo* deletions are listed in **Table 1**. The strain E2152, devoid of these 3 surface appendages, was selected as a reference for comparing AFM data and electrokinetic results with those obtained for the strains E2146, E2498 and E2302 which constitutively produces the external ultrastructure type 1 *fimbriae*, the Ag43 protein and the type-F pili, respectively (**Fig 1**). Constitutive expression of the Ag43 protein was previously obtained by placing a constitutive promoter in front of the *flu* gene [12] whereas constitutive expression of the type 1 *fimbriae* was previously obtained by placing a constitutive promoter in front of the *fimA-H* operon [51]. Production of the F *pili* was obtained by introducing the F<sup>tet</sup> plasmid into the reference strain E2152 by conjugation, creating E2302. All constructions were verified by PCR. The E2152, E2146, E2302 and E2498 strains deleted for- or selectively expressing- the three different appendages listed above were phenotypically checked before proceeding with the experiments reported in this study. All three strains displayed phenotypes in line with previous description [12,47,52]. In details, we systematically verified that i/absence and constitutive production of type 1 *fimbriae* were respectively verified by deficiency in- or enhancement of- yeast agglutination and biofilm formation; ii/absence and constitutive production of the Ag43 adhesin were respectively verified by deficiency in- or enhancement of- autoaggregation as well as by Western Blot immunodetection; iii/presence of the F *pili* was verified by sensitivity to phage M13 and increased biofilm formation (Table S1).

### Biological functions and characteristics of the surface appendages examined in this study

Type 1 *fimbriae*, constitutively expressed in E2146 strain, are filaments consisting of proteins called fimbriin anchored at the outer bacterial membrane. They exhibit a rod-shaped and helical structure of total contour length 1 to 10  $\mu$ m and diameter 6 to 20 nm [53,54]. Type 1 *fimbriae* play an important role in biofilm formation, bacterial pathogenicity and virulence [46] essentially because these structures render possible host cell colonization by bacteria. A protein called the FimH adhesin is located at the extremity of each *fimbriae*, and ensures adhesion to host cells following docking mechanism [55,56]. Type-F *pili* or sex *pili* expressed in E2302 strain are associated to conjugation [57,58]. They may be described as helically built tubules with a hollow core of 2 to 4 nm in diameter and a 10 to 100  $\mu$ m long flexible filament [59] which consists of repeating units of pilin. These filamentous

**Table 1.** Genetic and phenotypic characteristics of the studied bacteria.

Strain or plasmid	Relevant genotypic and phenotypic characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
MG1655 <i>gfp</i>	MG1655_λ.attamp- <i>gfp</i> , Amp <sup>R</sup> GFP+	[12]
MG1655Δ <i>fli</i>	Δ <i>fliE</i> -R: <i>cat</i> , Cm <sup>R</sup> deletion of <i>fliE</i> to <i>fliR</i> genes by λ-red recombination no flagella	This study
MG1655Δ <i>fim</i>	Δ <i>fimAICDFGH</i> : <i>zeo</i> , Zeo <sup>R</sup> deletion of <i>fimA</i> to <i>fimH</i> genes by λ-red recombination no type 1 fimbriae	This study
MG1655Δ <i>flu</i> : <i>km</i>	Δ <i>flu</i> : <i>km</i> , Km <sup>R</sup> deletion of the <i>flu</i> gene by λ-red recombination no Ag43 protein	This study
MG1655Δ <i>flu</i> : <i>zeo</i>	Δ <i>flu</i> : <i>zeo</i> , Zeo <sup>R</sup> deletion of the <i>flu</i> gene by λ-red recombination no Ag43 protein	This study
MG1655 <i>kmPcLfim</i>	<i>fimAICDFGH</i> operon placed under the control of the <i>kmPcLrbs</i> cassette λP <sub>R</sub> promoter, Km <sup>R</sup> constitutive type 1 fimbriae	[51]
MG1655 <i>kmPcLflu</i>	<i>flu</i> gene placed under the control of the <i>kmPcLrbs</i> cassette λP <sub>R</sub> promoter, Km <sup>R</sup> constitutive Ag43	[12]
MG1655_F'tet	Strain containing the F conjugative plasmid, Tet <sup>R</sup> constitutive F pili	[47]
E2152	<i>gfp_ΔfliE</i> -R: <i>cat_Δflu</i> : Km_Δ <i>fimAICDFGH</i> : <i>zeo</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup> subsequent P1vir transduction of Δ <i>fliE</i> -R: <i>cat</i> , Δ <i>flu</i> : <i>km</i> and Δ <i>fimAICDFGH</i> : <i>zeo</i> in MG1655 <i>gfp</i> GFP+, no flagella, no Ag43 protein, no type 1 fimbriae, no F factor	This study
E2146	<i>gfp_ΔfliE</i> -R: <i>cat_Δflu</i> : <i>zeo_kmPcLfim</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup> subsequent P1vir transduction of Δ <i>fliE</i> -R: <i>cat</i> , Δ <i>flu</i> : <i>zeo</i> and <i>kmPcLfim</i> in MG1655 <i>gfp</i> GFP+, no flagella, no Ag43 protein, no F factor, constitutive type 1 fimbriae	This study
E2498	<i>gfp_ΔfliE</i> -R: <i>cat_ΔfimAICDFGH</i> : <i>zeo_kmPcLflu</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup> subsequent P1vir transduction of Δ <i>fliE</i> -R: <i>cat</i> , Δ <i>fimAICDFGH</i> : <i>zeo</i> and <i>kmPcLflu</i> in MG1655 <i>gfp</i> GFP+, no flagella, no type 1 fimbriae, no F factor, constitutive Ag43	This study
E2302	<i>gfp_ΔfliE</i> -R: <i>cat_Δflu</i> : Km_Δ <i>fimAICDFGH</i> : <i>zeo_F'tet</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> conjugation of F'tet within E2152 GFP+, no flagella, no Ag43 protein, no type 1 fimbriae, F+	This study
<b>Plasmids</b>		
pKOBEG	pSC101 ts (replicates at 30°C), <i>araC</i> , arabinose-inducible λredγβx operon, Cm <sup>R</sup>	[50]

Relevant genotype and phenotype characteristics of the various *E. coli* mutants selected for this study.  
doi:10.1371/journal.pone.0020066.t001

structures allow genetic transfer of plasmid genes [60,61] but also infection by specific bacteriophages [62]. F pili have been shown to strongly promote adhesion to abiotic surface and biofilm formation [47]. Furthermore, we constructed a strain constitutively expressing Antigen 43 protein (E2498). The Ag43 protein is constituted by 2 different polypeptides and forms a ~10 nm long structure known to be rigid [63]. This abundant outer membrane protein in *E. coli* belongs to the autotransporter family, promotes bacterial autoaggregation and biofilm formation, and is associated to urovirulence [20,45,64].

### Growth conditions

Bacteria were pre-grown overnight at 37°C under agitation (150 rpm) in M3B1 minimal medium supplemented with 0.4% glucose (M63B1glu) and with the appropriate antibiotic for the proper selection of the strain of interest. The following day, fresh M3B1glu medium was inoculated with the overnight culture to an OD<sub>600</sub> of *c.a.* 0.05 and cultivated under the same conditions until the biomass reached an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.6.

Bacterial cells dedicated to AFM studies were extensively washed with 50 ml of 1 mM KNO<sub>3</sub> (see details below) while cells dedicated

to electrokinetic study were washed once in KNO<sub>3</sub> salt medium prior to use: the cultures (10 mL aliquots) were centrifuged at 5000 g for 15 min at a temperature of 4°C, supernatants were then eliminated and the pellets were resuspended in an equal volume of KNO<sub>3</sub> aqueous solution (of concentration 1 mM to 100 mM, range examined for electrophoresis analysis). Cells were centrifuged (5000 g, 4°C, 15 min) a second time and cell pellets were finally resuspended in KNO<sub>3</sub> solution before use for electrokinetic experiments. The bacterial suspensions were adjusted in ionic strength upon addition of appropriate aliquots of 1 M KNO<sub>3</sub> electrolyte solution. We verified that gentle centrifugation in the range 2000 g–5000 g did not impact the reported electrophoretic mobilities of our selected bacteria, recalling that electrophoresis is mostly sensitive to physico-chemical properties of their outermost peripheral region [65]. Concerning AFM experiments that probe internal parts of the bacteria *via* indentation experiments, we rather chose avoiding centrifugation of the bacteria in order to fully guarantee the absence of perturbation of their mechanical properties following change in physiology and/or ruptures of some of their surface appendages. Our experience is that, depending on the type of bacterial strain considered, centrifugation might lead to

**Table 2.** Genetic sequences characteristics of the studied bacteria.

Target gene	Primer name	Sequence
Primers used to generate deletion mutants in different <i>E. coli</i> strains		
<i>fliE-R</i>	<i>fliR.500-5</i>	gttgattaatgatgagccttg
	<i>fliE.500-3</i>	tccaagacaactgactaact
	<i>fliR.cat.L-3rev</i>	CTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGttccgtaacgtttatcatgtttac
	<i>fliE.cat.L-5rev</i>	GATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAAggtttgtaacctgttgtaattac
	<i>fliR.ext-5</i>	gaccaatagatattcatcaa
	<i>fliE.ext-3</i>	ctaattgggtgtaacttaccat
<i>flu</i>	<i>flu.A1.500-5</i>	CCCgAATTCTgCggTggACCggATATTTg
	<i>flu.B1.500-3</i>	atttccttgctgatacttc
	<i>flu.A2GB-L-3</i>	gattttgagacacaacgtggctttCATcagcttttccttagattg
	<i>flu.B2.GB-L-5</i>	cttcacgaggcagacctcagcgccTAAcagaacctcgcctctctgtg
	<i>flu.ext-5</i>	atcagctggtcagtgcgctc
	<i>flu.ext-3</i>	atcagtgacggtgaaatc
	<i>flu.zeo.L-5</i>	TTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGAcagaacctcgcctctctgtg
	<i>flu.zeo.L-3</i>	GTC AACACGTGCTCGGATCCAGAACATcagcttttccttagattg
<i>fimA-H</i>	<i>fimA.500-5</i>	GAGAAGAGGTTTGATTTAACT
	<i>fimH.500-3</i>	TCCAGCAACTGGTCAGCTGGTT
	<i>fimA.zeo.L-3</i>	GTC AACACGTGCTCGGATCCAGAAGCTGCTTTCCTTCAAAAAA
	<i>fimH.zeo.L-5</i>	TTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGAGAAATCACAGGACATTGCTAATG
	<i>fimA.ext-5</i>	CTTGACCTTAATGAAGGTAG
	<i>fimH.ext-3</i>	TTTCGGCGTTTCGATTCTGGTGC

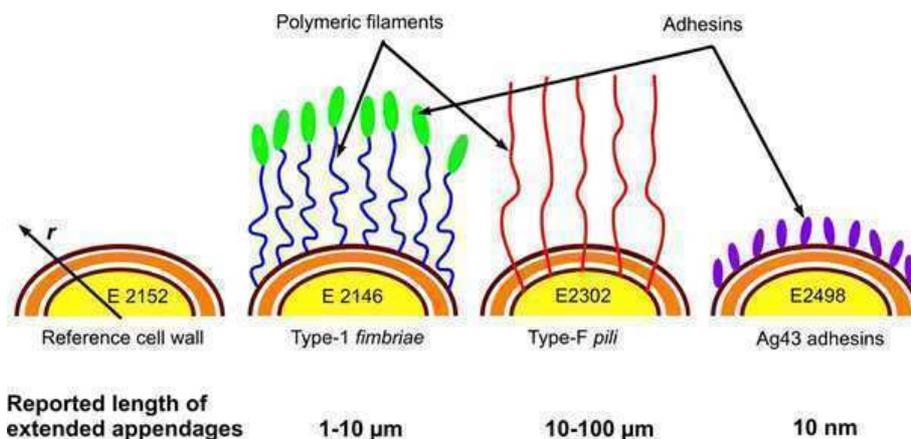
<sup>a</sup>Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tet, tetracycline; Zeo, zeocin. Primers used to construct the  $\Delta fliE-R$ : *cat*,  $\Delta flu$ : *km* and the  $\Delta fimA-H$ : *zeo* deletions are listed here. doi:10.1371/journal.pone.0020066.t002

important surface structure modification as observed *e.g.* for *Pseudomonas fluorescens* (paper in preparation).

**Electrophoretic mobility measurements**

Electrophoretic (electrokinetic) mobility (EPM) measurements were performed in a quartz suprasil cell at 24°C (Zetaphoremeter IV, CAD Instrumentations, Les essarts le Roi, France) and were determined from the reflection by bacteria of a laser beam tracked

with a charge-coupled device camera. Using an image analysis software, recorded images were processed in real time to calculate the electrophoretic mobilities from the displacement (migration motion) of bacteria subjected to a constant direct-current electric field (800 V/m). Different cycles were recorded to carry out 100 measurements of bacterial mobility for a given KNO<sub>3</sub> electrolyte concentration in the range 1 mM to 100 mM. Additionally, the reproducibility of the experiments was addressed by repeating the



**Figure 1.** Spatial organization of the external structures for the various *E. coli* strains investigated. Pili and fimbriae are structures with reported total lengths of about ~10-100 μm (E2302) and ~1-10 μm (E2146), respectively, while antigen Ag43 protein layer is a short and rigid structure ~10 nm thick (E2498).

doi:10.1371/journal.pone.0020066.g001

electrokinetic measurements with at least three different fresh bacterial dispersions.

**Electrophoretic mobility data processing for a soft bacterial particle**

The ionic-strength dependence of the electrophoretic mobility data was quantitatively interpreted using the electrokinetic theory for cylindrical soft particles developed by Duval *et al.* and extensively described in [65]. For the sake of completeness, the modeling of the bacteria together with the basic physical elements of the aforementioned theory are briefly recalled below. The reader is referred to [65] for more complete details.

**Theoretical representation of the bacterium/aqueous medium interphase.** The bacteria of interest here may be assimilated to rod-like bioparticles of length  $L$  at the surface of which the cell wall and its appendages can be represented by a permeable, charged gel-like layer which exhibits a certain propensity for fluid (electroosmotic) flow penetration during the field-driven motion of the bacteria. Because of the presence of such permeable component, bacteria are recognized as paradigms of so-called soft (*i.e.* permeable) biocolloids [66,67]. The bacteria are modeled here as soft particles comprised of (i) a hard-core of radius  $a$ , which is impermeable to electroosmotic flow and corresponds to the cytoplasmic part, and (ii) the permeable charged gel-like layer, of thickness  $d$ , located at the bacterial periphery around the cytoplasm. When modeling the electrokinetic behavior of the bacteria, it is necessary to account for the effect of interphasial swelling and corresponding chain heterogeneity on the local distribution of the material density within the bacterial soft envelope [65,68]. This can be achieved by necessarily abandoning the conventional picture of the bacterial soft structure viewed as a homogeneous permeable (step-like) layer. Instead, we represent the bacterial interphase as a soft polyelectrolyte layer of which the density gradually decays from maximum value within the bulk gel-like layer to zero in the electrolyte solution. Without any detailed molecular information on the local distribution of the soft matter that surrounds the cytoplasm, the radial density distribution,  $f(r)$ , of material that constitutes the permeable charged gel-like layer may be described by a function of the form [65]:

$$f(r) = \frac{n(r)}{n_0} = \frac{1}{2} \omega \left\{ 1 - \tanh \left( \frac{r - (a + d)}{\alpha} \right) \right\} \quad (1)$$

where  $n_0$  is the nominal density of soft material for a homogeneous gel layer distribution,  $n(r)$  is the radial dependence of the density of soft matter within the permeable charged gel-like layer,  $r$  the radial position according to the polar coordinate system taken at the center of the particle (see **Fig 1**). The characteristic parameter  $\alpha/d$  represents the degree of the diffuseness (or extension) of the interphase with the limit  $\alpha/d \rightarrow 0$  implying a step-like or homogeneous soft layer distribution. The dimensionless parameter  $\omega$  is obtained from the required condition that the total quantity of gel material is constant upon variation of the interfacial diffuseness as subsumed in the ratio  $\alpha/d$ . For highly hydrated soft surface layers and assuming uniform distribution of charges along a single chain, it was demonstrated that  $f(r)$  pertains to the distribution of the local friction exerted by the gel layer on electroosmotic flow and to the spatial dependence of the density of charges carried by the gel layer [68]:

$$f(r) = \frac{\rho_{\text{fix}}(r)}{\rho_0} = \left( \frac{\lambda(r)}{\lambda_0} \right)^2 \quad (2)$$

where  $\rho_0$  and  $\lambda_0$  are the volume density of fixed charges and the hydrodynamic softness parameter within homogeneously distributed soft gel-like structure (limit  $\alpha/d \rightarrow 0$ ), respectively. The quantity  $1/\lambda_0$  defines the characteristic penetration length of electroosmotic flow within the permeable gel-like layer while  $\rho_{\text{fix}}(r)$  and  $\lambda(r)$  denote the local volume charge density and hydrodynamic softness throughout the permeable part of the particle, respectively. A major advantage for introducing the quantity  $\alpha$  in the representation of the bacterial soft component is that it allows for accounting situations where interfacial swelling takes place, with as a result an expansion of the gel layer, *i.e.* increase of its thickness [68,69]. Based on the profile expressed by eq 1, the overall extension of the soft layer is about  $d + 2.3\alpha$  [68]. This extension is accompanied by an increased friction exerted by the outer edge of the bacterium soft layer on the electroosmotic flow, thereby reducing the magnitude of the mobility [68]. This feature, theoretically and experimentally addressed in previous publications [65,68,70], illustrates the utmost role played by polymer tails on hydrodynamic flow field developments, as qualitatively recognized long ago by Cohen-Stuart *et al.* [71,72].

**Electrokinetic model for a rod-like, diffuse soft particle.** For a given electrolyte composition, the electrophoretic mobility  $\mu$ , which is accessible by the experiment, is dependent on the various electrohydrodynamic quantities (*i.e.* the parameters  $\rho_0$  and  $\lambda_0$ ) pertaining to the bacterial cell wall or surface appendage assimilated to the gel-like layer, on its thickness, on the radius of the cytoplasm (core bacterial component) and also on the soft material distribution (homogeneous or diffuse) in the  $r$ -direction, *i.e.* on  $\alpha/d$ . For a cylindrical particle,  $\mu$  further depends on the orientation of the particle-long axis relatively to the direction of the applied electric field [65] and see further references therein

$$\mu = \frac{2}{3} \mu_{\perp} + \frac{1}{3} \mu_{//}, \quad (3)$$

where  $\mu_{\perp}$  and  $\mu_{//}$  are the electrophoretic mobilities of the cylindrical particle with its axis perpendicular and parallel to the applied electric field, respectively. The components  $\mu_{\perp}$  and  $\mu_{//}$  are obtained upon collocation-based numerical resolution [73] of the set of coupled Navier-Stokes, Poisson Boltzmann and continuity governing equations explicitly detailed in [65] for a particle of cylindrical geometry in an electrolyte of dielectric permittivity  $\epsilon_0 \epsilon_r$  composed of  $i = 1, \dots, N$  different ionic species with valency  $z_i$ , and bulk concentration  $c_i^{\infty}$ . This theory does not suffer from any restriction on the magnitude of the particle core and shell sizes nor on the magnitude of the electrostatic potential within the shell layer. As such, it constitutes an extension of the approximate formalism by Ohshima [74,75,76] which is strictly applicable in the high ionic strength limit where electric double layer polarization phenomena are insignificant [70]. A review of successful applications of diffuse soft particle electrokinetic formalism, as briefly outlined above in the case of cylindrical particles, may be found in [70]. These latter studies illustrate the potentiality of electrokinetic methods for determining (i) electrohydrodynamic and swelling properties of (bio)particles like bacteria [77], yeast cells [78], viruses [79], erythrocytes [69] or colloidal microgels, as well as the (ii) changes in interfacial properties upon (bio)particle surface modification following exposure to biospecific molecules or enzymatic actions [69,80].

**AFM measurements**

AFM images and force-distance curves were recorded using an MFP3D-BIO instrument (Asylum Research Technology, Atomic

Force F&E GmbH, Mannheim, Germany). Silicon nitride cantilevers of conical shape were purchased from Veeco (MLCT-AUNM, Veeco Instruments SAS, Dourdan, France), and their spring constants, denoted as  $k$ , were determined using the thermal calibration method [81], providing  $k$  values of  $\sim 10.4 \pm 1.7$  pN nm<sup>-1</sup>. Prior to experiment, the geometry of the tip was systematically controlled using a commercial grid for 3-D visualization (TGT1, NT-MTD Compagny, Moscow, Russia) and curvature of the tip in its extremity was found to lie in the range  $\sim 20$  to 50 nm. Experiments were performed in 1 mM and 100 mM potassium nitrate solution at pH $\sim 6.6$  and room temperature. Cells were electrostatically-immobilized onto polyethyleneimine (PEI)-coated glass slides according to a procedure detailed elsewhere [82]. Such method avoids the necessity to resort to chemical binders between substrate and bacterial sample, thus minimizing any chemical modification of bacterial cell wall/surface organization.

Glass slides were freshly prepared upon immersion in 0.2% PEI solution for 30 minutes, extensively rinsed with Milli-Q water, dried with nitrogen and stored in a sterile Petri dish. One mL of bacterial culture (OD<sub>600 nm</sub> $\sim 0.5$ – $0.6$ ) was directly deposited onto the PEI-coated glass slide for 20 minutes and then the bacteria-coated surface was extensively rinsed 3 times with Milli-Q water. We emphasize that high molecular weight PEI (750 000 to 1 000 000 g/mol) was used for avoiding desorption and interaction with bacterial cell wall, and the absence of PEI contamination onto tip and samples was systematically verified. This important point was extensively addressed in our recent paper [83] dealing with the methodology for analysis of approach curves on *E. coli* 2152 and retraction curves on *Pseudomonas fluorescens* (construction of force volume images). In particular, it was verified that PEI did not alter the selectivity of (functionalized) tip with respect to given molecular compounds present on *Pseudomonas fluorescens* surface. In addition, the high molecular weight of PEI (polycationic polymer) used in this study forms a very stable monolayer strongly bond to (negatively charged) glass substrate due to important (attractive) electrostatic interaction. To the best of our knowledge, no PEI adsorption phenomenon has yet been reported in literature under the experimental conditions of interest here. Having in mind those elements, each bacterial sample was extensively rinsed with 50 ml of 1 mM KNO<sub>3</sub> and then was immediately transferred into the AFM liquid cell with addition of 2 ml of KNO<sub>3</sub> solution of adjusted concentration and pH $\sim 6.6$ . Finally, we mention that bacteria immobilized onto the PEI-coated substrate were extensively rinsed with KNO<sub>3</sub> in order to get rid of un-adhered free bacteria and possibly remaining residues from minimum growth medium.

### Nanomechanical AFM data processing

Mechanical properties were measured by recording a grid of 32-by-32 and 16-by-16 force curves obtained upon approach of the tip to the bacteria, using a maximum applied force of 4 to 5 nN in order to avoid sample damage. The bacterial spring constant,  $k_{\text{cell}}$ , was determined from the slope of the linear portions of the raw deflection *versus* piezo displacement curves [84,85,86] according to:

$$k_{\text{cell}} = k \left( \frac{s}{1-s} \right) \quad (4)$$

with  $s$  the experimentally accessible slope of the compliance region reached for sufficiently large loading forces. The bacterial Young modulus was obtained by interpreting the non-linear regime in the force *versus* indentation curves according to Sneddon model [87]:

$$F = \frac{2E \tan(\sigma)}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (5)$$

where  $F$  is the loading force,  $\delta$  the indentation depth,  $E$  the Young modulus,  $\nu$  the Poisson coefficient, and  $\sigma$  the semi-top angle of the tip. Equation 5 refers to cases where compression and deformation of a soft planar interface is occasioned by a tip of conical geometry [88]. Recalling that the curvature radii of the probed bacteria are about two orders of magnitude larger than that of the tip we can consider a cone/plan contact for describing mechanical interaction. In addition, though eq 5 truly holds for indentation depths below the curvature radius of the AFM tip (*i.e.* in the first  $\sim 50$  nm of indentation), we verified that description of experimental data with eq 5 was very satisfactory for larger indentations. Young Moduli resulting from force curve interpretation over the whole non-linear indentation regime (including the first 50 nm where Sneddon model is accurate) or within the first 50 nm only, very well compare to magnitudes reported in literature for bacteria. Young moduli were determined for a piezodriven speed of 1000 nm/s (0.5 Hz), which ensures full relaxation of the bacterial surface structure upon successive measurements, as verified from additional experiments carried out at different speeds of piezodriven. This also fully justifies the use of the static physical model of Sneddon as adopted in our analysis. In addition, the model is valid for elastic surfaces on the premise that tip-surface adhesion is absent or insignificant. For the bacterial systems of interest here, this restriction is satisfied in view of the very low magnitude of the adhesion forces ( $< 0.01$  nN) measured upon retraction of the tip from the bacteria. The mathematical analysis was performed on 1024 measured force curves with an automatic Fortran C++ algorithm described elsewhere [37,89] using  $\sigma = 35^\circ$ , as inferred from tip geometry, and  $\nu = 1/2$ . Under low ionic strength condition (1 mM salt concentration) and for loading forces typically lower than 0.1 nN, we systematically observed slight deviations of the indentations curves from those predicted according to eq 5. This feature will be analyzed in more details in a forthcoming publication. It is assigned to the effects of electric double layer repulsion and/or steric interaction between bacterial interphase and AFM tip [90,91]. A detailed analysis of the force-separation distance curves (*i.e.* in the regime where there is no contact between tip and bacterium surface) reveals that the typical characteristic length of interaction between E2152 and tip in 1 mM electrolyte concentration is about 11 nm [83], which very well corresponds to the Debye layer thickness expected from theory at such salt content in solution. This supports the idea that the short range interactions between E2152 and tip, as measured by AFM, are predominantly governed by electrostatics, at least in case of the bare E2152 strain devoid of long surface appendage. For all strains, we scrupulously verified that ignoring the region where electrostatic/electrosteric interactions come into play for appropriately positioning the contact point between AFM and bacteria, leads to an error in the determination of Young moduli of about 1 to 4% in the worst cases, which remains within the error bar of AFM data (see details in **Figs S1-S2** and **Histogram S2** therein). In this study, ignoring the electrostatic/electrosteric part of the force curves for evaluating the nanomechanical parameters is justified in view of (i) the significant difference between spatial range of mechanical indentation and that where electrostatic forces are operative and (ii) the low value reported for the typical magnitude of electrostatic forces ( $\sim 0.1$  nN, (38)) as compared to that of the loading forces (0–5 nN).

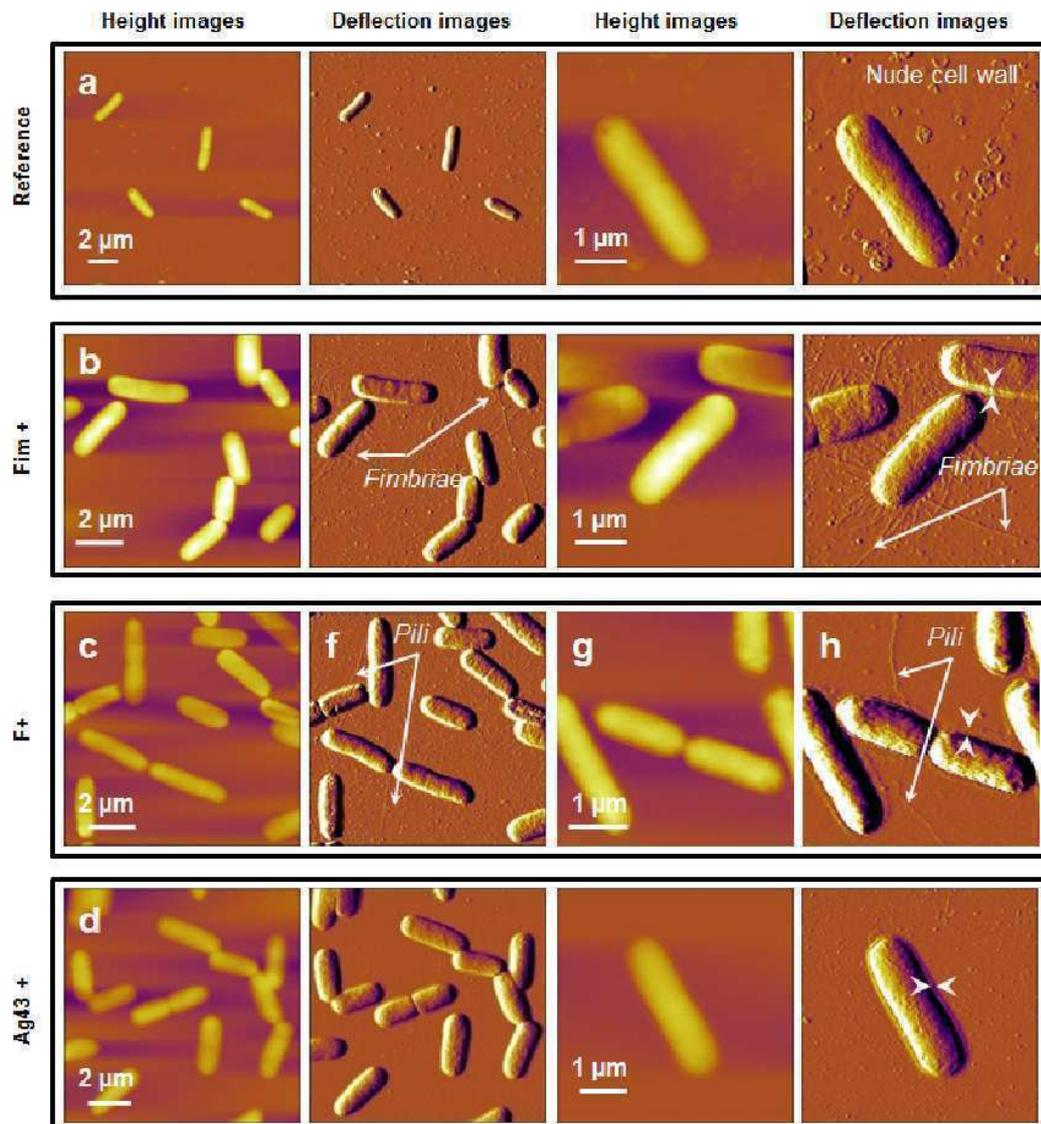
## Results

### Bacterial cell surface imaging

In order to correlate the presence or absence of surface appendages with their genetic and phenotypic characteristics, the four bacterial strains considered in this study were first imaged in air using AFM in contact mode. For that purpose, the bacteria-coated PEI surfaces were rinsed and gently dried with nitrogen. Additionally, while the resolution of the height images was limited due to the large curvature of the analyzed rod-shaped cells, deflection images were found to be significantly more sensitive to bacterial surface relief and morphological details, as shown in **Fig 2**.

The AFM images reported in **Fig 2** point out that E2152 bacterial strain can be assimilated to a 3  $\mu\text{m}$  long rod-shaped cell of diameter 0.8  $\mu\text{m}$  (**Fig 2a**). As expected, E2152 bacterial cell

envelope did not exhibit any visible surface appendage. In the case of E2146 (**Fig 2b**) and E2302 (**Fig 2c**) strains, filamentous structures could be distinctly observed. Quantitative analyses of the images performed on a statistically representative number of cells provides appendage length for the E2146 strain in the range 0.2 to 10  $\mu\text{m}$  with a diameter of about 10 nm, values that are in good agreement with those reported in literature for type-1 *fimbriae* [54,92]. Additionally, it is found that E2146 cells are surrounded by a 100 nm to 200 nm thick layer, as materialized by the white arrows depicted in **Fig 2b**. This layer, absent from the E2152 *E. coli* reference strain, probably consists of partially bent *fimbriae*. A heterogeneous envelope composed of 2  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$  long filaments ( $\sim 10$  nm in diameter) could be identified for the E2302 strain (**Fig 2c**). In view of the genetic construction of this strain, these filaments are identified as *F-pili*. Their dimension corresponds to the low size limit as reported in [93,94] for such

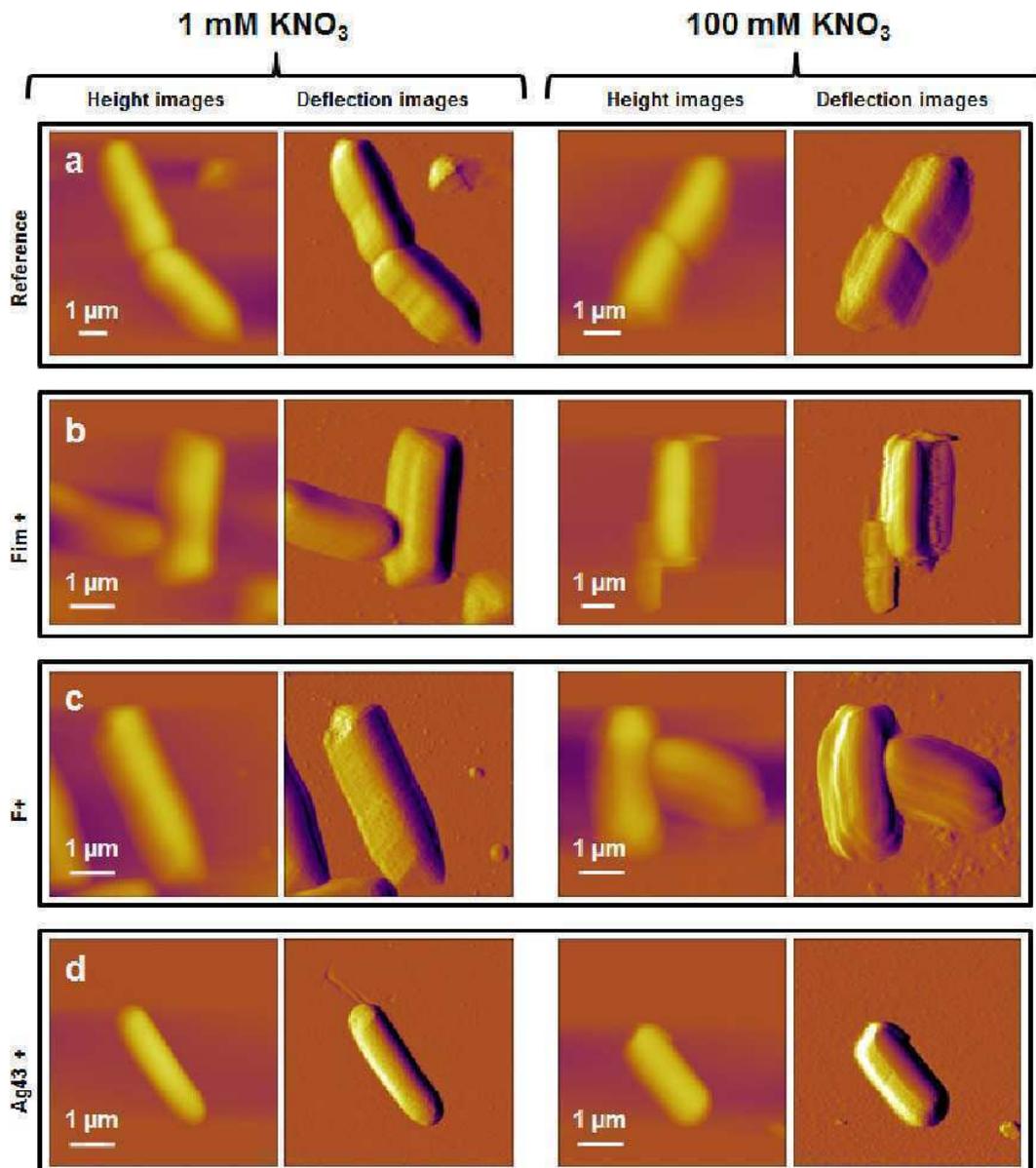


**Figure 2. Bacterial morphology observed by AFM in air (contact mode).** AFM height and deflection images ( $z$ -scale = 200 nm) recorded in air for *E. coli* cells immobilized on a PEI-coated glass surface. a) E2152 b) E2146 c) E2302 d) E2498. The white arrows correspond to the thickness of a layer that surrounds the bacteria (see details in main text). doi:10.1371/journal.pone.0020066.g002

surface appendage. Similarly to E2146, E2302 further exhibits a 50 nm thick layer around the cell wall, the origin of which possibly stems from the presence of partially or completely stretched *F-pili* along the cell wall. No filamentous surface appendage could be evidenced for the E2498 strain (**Fig 2d**), in line with previous SEM studies indicating that Ag43 does not form recognizable extended surface structure [63]. Despite this, the presence of a peripheral 50 nm thin layer around E2498 cells could be unambiguously detected and it is believed that this layer reflects the presence of the expected Ag43 coating. The thickness of this protein layer is however larger than that reported in literature [45,95]. Such discrepancy is possibly attributed to strong convolution of the image by particle geometry, recalling that curvature and edges of

the cantilever tip of radius 20 to 50 nm are expected to contribute when imaging thin surface envelopes like Ag43 protein layer [96].

Following the previous findings, attempts were done to image the various bacteria in 1 mM and 100 mM  $\text{KNO}_3$  aqueous electrolyte so as to appreciate the dynamics of the above identified surface structures with varying salt medium content. Unfortunately, AFM technique used in contact mode turned to be inappropriate for imaging refined details pertaining to the bacterial surface ultrastructures of interest under wet conditions, as illustrated in **Fig 3**. This difficulty is imputed to the easy dislodging of the surface appendages by the AFM tip operating in fluid media according to contact mode, argument already mentioned by several authors [39,97]. The required stress exerted



**Figure 3. Bacterial morphology observed by AFM in aqueous medium (contact mode).** AFM height and deflection images ( $z$ -scale = 2  $\mu\text{m}$  and  $d$ -scale = 50 nm) recorded in 1 mM (left) and 100 mM (right)  $\text{KNO}_3$  aqueous solution for a single *E. coli* cell immobilized on a PEI-coated glass surface ( $z$ -scale = 2  $\mu\text{m}$  and  $d$ -scale = 50 nm). a) E2152 b) E2146 c) E2302 d) E2498. doi:10.1371/journal.pone.0020066.g003

by the tip on the bacterial structure for appropriate imaging of flexible *F-pili* or *fimbriae* filaments probably exceeds the forces responsible for their anchoring to the cell membrane and/or leads there to spatial displacement, thus rendering inefficient any surface scan for unraveling morphological details. Despite this limitation, images of bacteria as depicted in **Fig 3** allow for retrieving quantitative morphological information for the bacteria as a whole, in particular their propensity to swell or shrink when changing salt concentration.

The E2152 reference strain may be assimilated to a  $2.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  long smooth rod-shaped cells with a diameter of about  $1.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$  in 1 mM  $\text{KNO}_3$  solution, while  $1.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$  long cells with diameter of  $0.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$  are observed in 100 mM salt concentration (**Table 3**). In addition, root mean square (r.m.s) roughness of the E2152 mutant - as determined from analysis of the bacterial topography over a  $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$  surface area - decreases from  $1.2 \pm 0.5 \text{ nm}$  to  $0.7 \pm 0.5 \text{ nm}$  when increasing  $\text{KNO}_3$  salt concentration from 1 mM to 100 mM (**Table 4**). Qualitatively, a similar concentration-dependence of the r.m.s roughness and bacterial dimensions is found for E2146, E2302 and E2498 mutants (see details of data in **Tables 3-4**). Quantitatively, these results suggest a mean volume contraction (shrinkage rate) from 1 mM to 100 mM electrolyte concentration that is significantly larger for the bare E2152 strain (~73%) as compared to that for other cell mutants (~63%-65%). Furthermore, for a given ionic strength, r.m.s roughness for the strains exhibiting surface appendage at their outer periphery, is systematically larger than that for bare E2152 cells, result that is intuitively expected.

**Nanomechanical properties of the bacterial strains**

To determine the nanomechanical properties of the four bacterial strains of interest in this study, force-distance curves were recorded, converted into force-indentation curves, and subsequently analyzed according to eqs 4 and 5 for determining the bacterial spring constant, related to the inner Turgor pressure of the cell, and the Young modulus that reflects cell surface elasticity/rigidity. Also, use of 3D force volume mode rendered possible the generation of spatial distribution of Young Modulus (elasticity map) at the bacterial surface. **Fig 4** shows these elasticity maps for the four cells (a, b, c and d) in 1 mM  $\text{KNO}_3$  solution, together with the dispersion in Young modulus values as determined within the spatial region indicated by the white windows on the elasticity maps. Also, for the sake of illustration,

**Table 3.** Morphological characteristics of cells investigated in aqueous medium.

Strains	1 mM $\text{KNO}_3$		100 mM $\text{KNO}_3$		Average shrinkage (%)
	Length	Diameter	Length	Diameter	
	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	
2152	$2.9 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.2$	~73%
2146	$2.8 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.1$	~63%
2302	$2.9 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$	~66%
2498	$2.7 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.3$	~63%

Morphological characteristics (length and diameter) averaged over measurements carried out on 10 cells in 1 mM and 100 mM  $\text{KNO}_3$ . The (average) extent to which cells shrink when passing from 1 mM to 100 mM solution is indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0020066.t003

**Table 4.** Mechanical characteristics of cells investigated in aqueous medium.

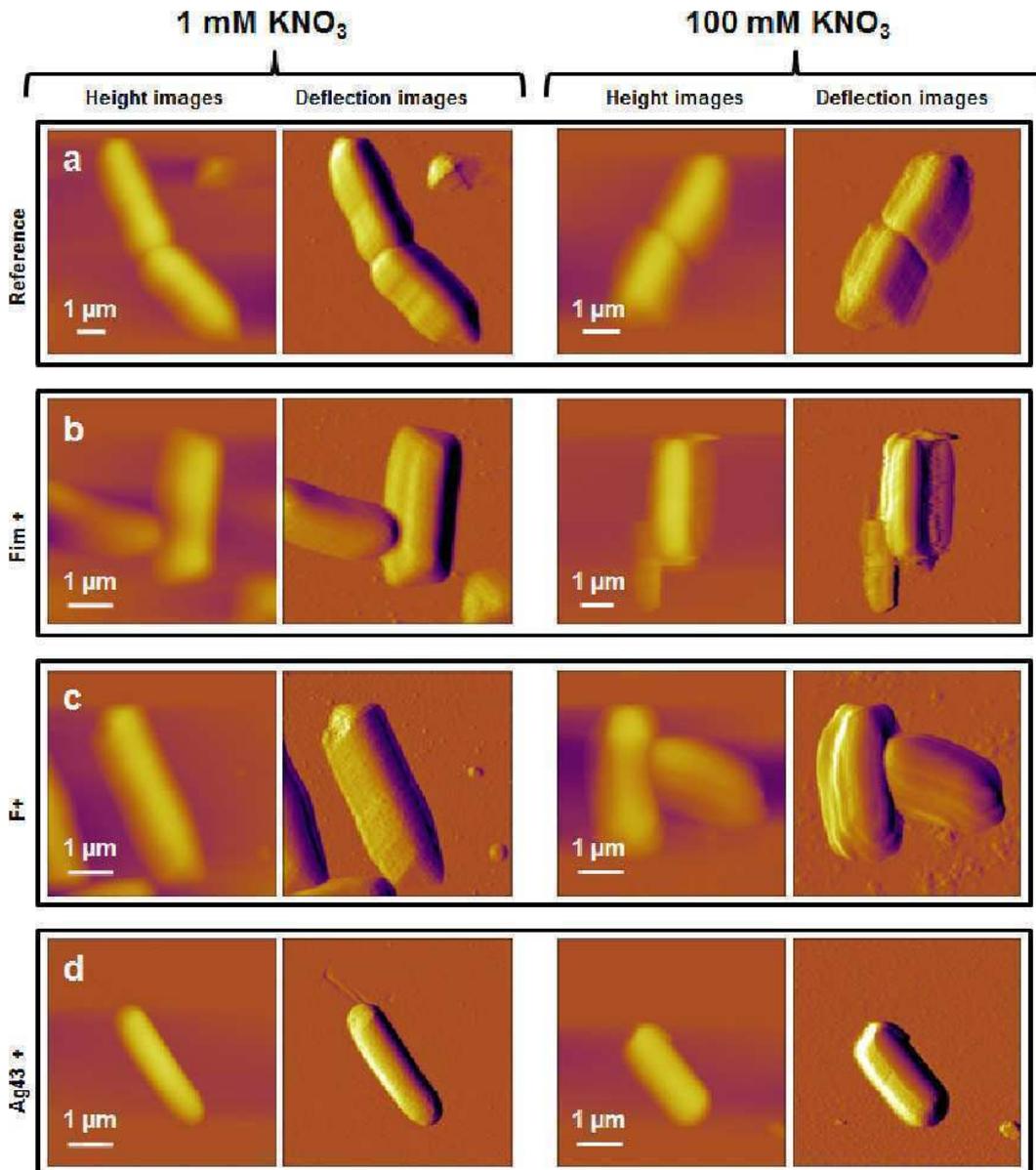
Strains	1 mM $\text{KNO}_3$		100 mM $\text{KNO}_3$	
	Non linear regime	Roughness	Non linear regime	Roughness
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
2152	20-30	$1.2 \pm 0.5$	50-80	$0.7 \pm 0.5$
2146	80-120	$1.5 \pm 0.6$	250-350	$1.1 \pm 0.8$
2302	80-120	$2.2 \pm 0.9$	180-250	$1.2 \pm 0.5$
2498	30-50	$1.7 \pm 0.5$	80-120	$\pm 0.4$

Mechanical characteristics (non linear regime) and average roughness carried out on 10 cells in 1 mM and 100 mM  $\text{KNO}_3$ . The (average) extent to which cells shrink when passing from 1 mM to 100 mM solution is indicated. Maximal indentation in the non-linear regime (Hertzian behavior) and roughness values as obtained from AFM images of  $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$  bacterial surface area. Values are indicated under 1 mM and 100 mM  $\text{KNO}_3$  electrolyte concentration conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0020066.t004

typical force-indentation curves are given for each strain and were found to be in agreement with the force-indentation relationship expected from Sneddon model (eq 5), thereby rendering possible determination of Young moduli. Consistent with the work of Gaboriaud *et al.* [65], the force curves recorded on cell surfaces exhibit a non-linear regime at low loading forces (eq 5) followed by a linear regime for higher forces (eq 4). Bacterial spring constant values,  $k_{\text{cell}}$ , were determined from the slopes of the linear portions of the force-versus-piezo displacement curves as described in Material & Methods section.

In **Fig 4** (1 mM salt concentration), the contrast in elasticity maps demonstrates that the cells were substantially softer than the PEI-coated glass slide for which a Young modulus of about tens of GPa is estimated. The curves recorded across the interphases formed between bacteria and aqueous medium yielded Young modulus of about 950 kPa for the reference E2152 bacteria, whereas for the other strains, elasticity was significantly lower with values of about 340, 500, and 700 kPa for E2146, E2302 and E2498, respectively (**Histogram S1a**). Elasticity maps recorded on the cells further showed a homogeneous contrast, indicating that curvature/edge effects did not influence substantially the shape of the force curves, as confirmed upon closer inspection of the dispersions in Young moduli values. The data further indicate that the presence of external polymeric structures obviously impacts the mechanical softness of the bacteria. Quantitatively, cell surfaces with type 1 *fimbriae* and *F-pili* are 3 to 2 times softer, respectively, as compared to that of E2152 cells devoid of these appendages. For the cell wall covered by Ag43 adhesins, elasticity is only 1.4 times softer than that determined for the reference strain. Additionally, the force-indentation curves clearly evidence that the range of indentation where non-linearity applies (eq 5), is depending on the presence and nature of bacterial surface appendages. For the reference bacteria, cell wall was non-linearly deformed over 20 to 30 nm while for E2146 and E2302 strains, this spatial range is about 80 to 120 nm. For E2498, the non-linear deformation spans over 30 to 50 nm. The bacterial spring constant  $k_{\text{cell}}$  of the various bacteria are further reported in **Histogram S1b**. In 1 mM  $\text{KNO}_3$  solution,  $k_{\text{cell}}$  is  $0.18 \pm 0.06 \text{ N/m}$  for the E2152 strain and for E2302, E2146 and E2498 cells, we obtain  $k_{\text{cell}}$  values of about 0.07, 0.08 and 0.11 N/m (see details in **Histogram S1b**), respectively. The here-determined magnitude of  $k_{\text{cell}}$  is in excellent agreement with that expected for gram-

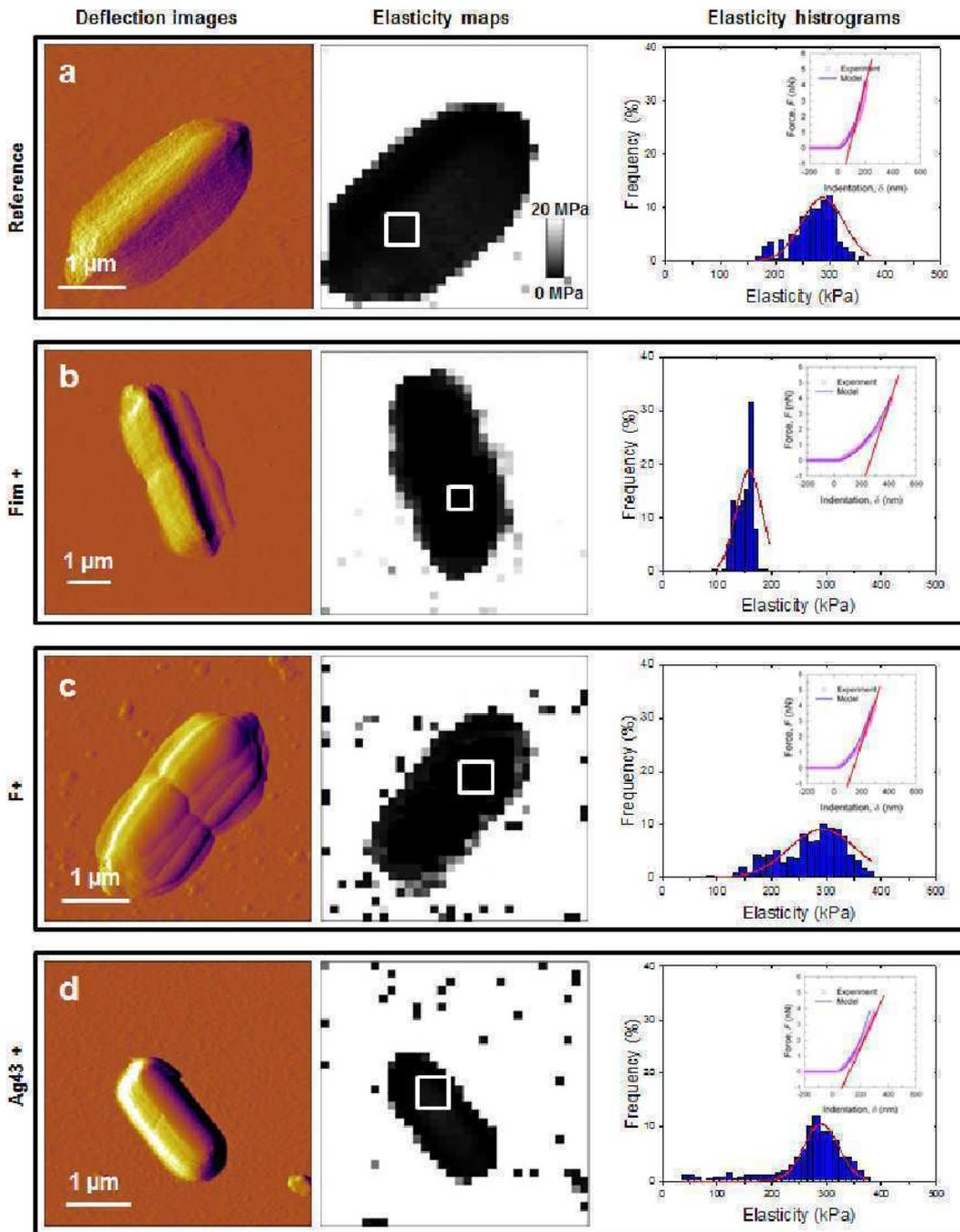


**Figure 4. Nanomechanical properties of bacteria investigated in 1 mM  $\text{KNO}_3$ .** Deflection images (first column), elasticity maps (scale 0–20 MPa) (second column) and Young modulus distributions (third column) obtained in 1 mM  $\text{KNO}_3$  solution for a) E2152 b) E2146 c) E2302 d) E2498. Young modulus distributions were calculated within the spatial range marked by the white window positioned in the corresponding elasticity map ( $n = 256$  force curves). Elastic (Young) moduli and bacterial spring constants were extracted from typical force-indentation curves shown in insets: open symbols are raw AFM data, solid lines stand for theoretical fits according to eq 5 (blue color, Hertzian non-linear regime) and straight lines represent fits on the basis of eq 4 (red color, linear or compliance regime associated to Turgor pressure contribution). doi:10.1371/journal.pone.0020066.g004

negative bacteria [38,98]. The Turgor pressure of each bacterium was estimated from Arnoldi equations [86] (see further details in caption of **Histogram S1c**) taking for  $k_{\text{cell}}$  the values commented above and further assuming that value of  $\lambda$ , the stretching modulus of the bacterial envelope, is in the range 0.1 to 0.2 N/m as suggested in [85,86,99]. The corresponding procedure is detailed in **Fig S3**. The average bacterial radius required for the calculation was 500 nm. As a result, we obtained for the reference bacteria a Turgor pressure of 280–350 kPa, magnitude that is in agreement with previous results [100]. For bacteria exhibiting surface appendages, the Turgor pressure is found to be

significantly lower with values in the range 80–120 kPa for bacteria with type 1 *fimbriae* and *F-pili*, and 150–200 kPa for bacteria covered by Ag43 adhesins. These rough estimations point out the role played by cell wall external structures for improving the stability of bacterial envelope against osmotic stress.

In **Fig 5**, mechanical measurements are shown under conditions where  $\text{KNO}_3$  concentration is 100 mM. Young moduli of about 300 kPa were obtained for the E2152 reference bacteria and we found moduli of 152, 320 and 298 kPa for E2146, E2302 and E2498, respectively (**Histogram S1a**). In addition, the deformation is non-linear over 50 to 80 nm for the E2152



**Figure 5. Nanomechanical properties of bacteria investigated in 100 mM KNO<sub>3</sub>.** Deflection images (first column), elasticity maps (scale 0–20 MPa) (second column) and Young modulus distributions (third column) obtained in 100 mM KNO<sub>3</sub> solution for a) E2152 b) E2146 c) E2302 d) E2498. Young modulus distributions were calculated within the spatial range marked by the white window positioned in the corresponding elasticity map (n = 256 force curves). Elastic (Young) moduli and bacterial spring constants were extracted from typical force-indentation curves shown in insets: open symbols are raw AFM data, solid lines stand for theoretical fits according to eq 5 (blue color, Hertzian non-linear regime) and straight lines represent fits on the basis of eq 4 (red color, linear or compliance regime associated to Turgor pressure contribution). doi:10.1371/journal.pone.0020066.g005

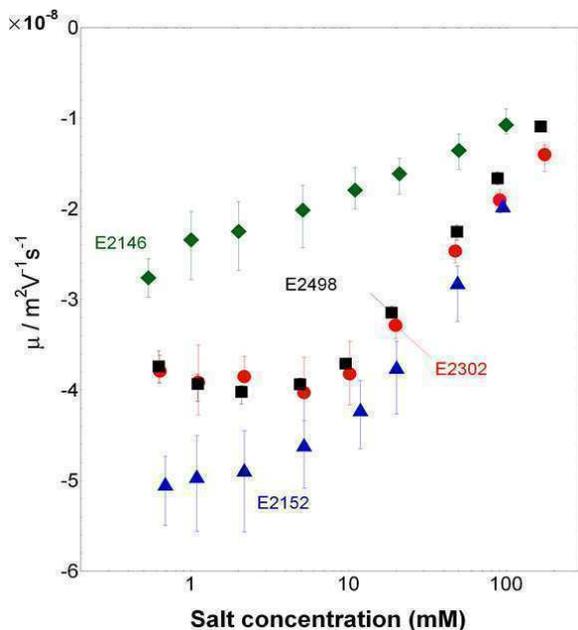
reference bacteria, while this characteristic distance of deformation is found to be significantly more important for E2146, E2302 and E2498 (350, 250 and 120 nm, respectively, see **Table 4**). At 100 mM salt concentration, no significant change

in  $k_{cell}$  value was found for the four bacterial strains examined (0.003 N/m, **Histogram S1b**), and the evaluation for the corresponding Turgor pressure leads to values in the range 20 to 40 kPa.

## Electrokinetics

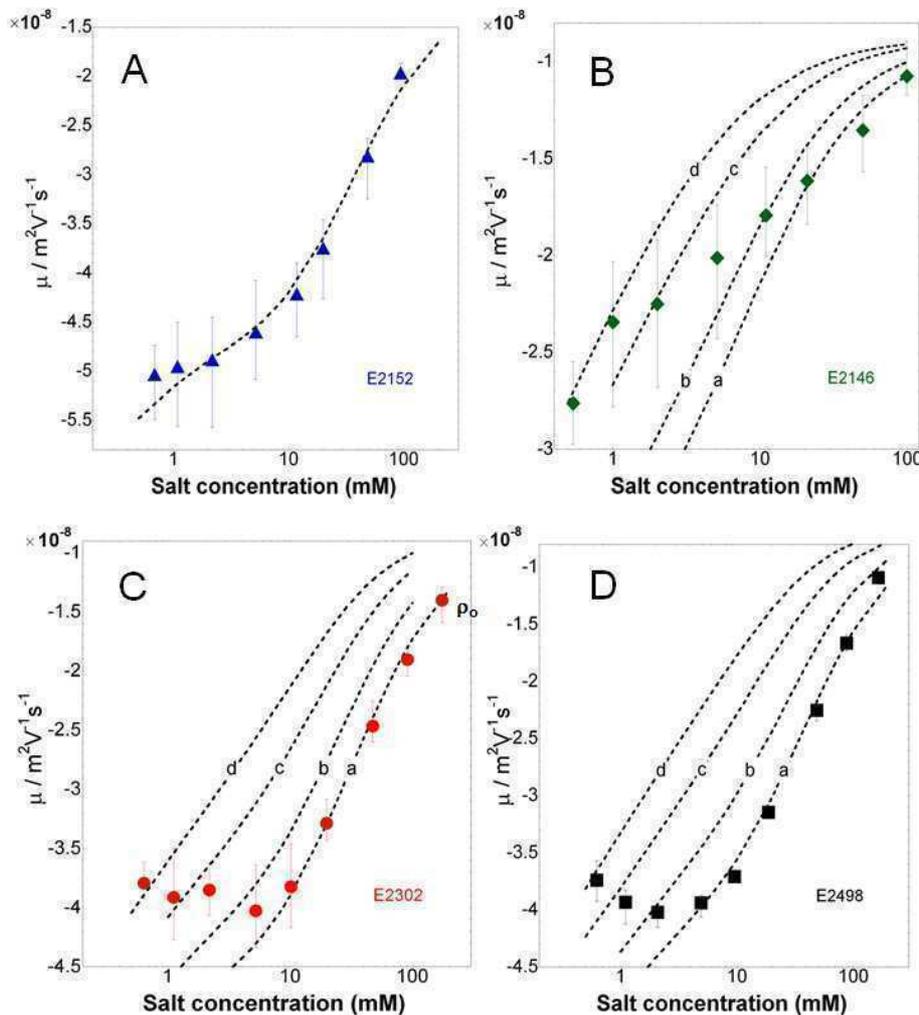
The dependence of the electrophoretic mobility  $\mu$  on ionic strength is reported for the bacterial strains E2152, E2146, E2302 and E2498 in **Fig 6**. For all strains,  $\mu$  is negative, as expected for biological particles [70], and decreases in absolute value upon increase of salt concentration, in agreement with enhanced screening of the charges embedded within the cell wall and/or surface appendage by ions present in the medium. The electrokinetic behavior of the cells is further typical of that for soft particles, as judged from the presence of an asymptotic plateau value for the electrophoretic mobility at sufficiently high ionic strengths [66], particularly evident when patterns depicted in **Fig 6** are plotted according to a linear scale in ionic strength. Additionally, similarly to the nanomechanical features of bacteria reported above, the presence/absence and nature of the surface appendage impact notably the electrokinetic properties of the cells.

In details, three types of behavior may be distinguished: that of the reference cell E2152, for which  $|\mu|$  and its increase with decreasing ionic strength is most significant; that of E2146 strain for which  $|\mu|$  is lowest at fixed concentration and its increase when lowering electrolyte concentration is least pronounced; and finally an intermediate behavior which is that of the strains E2302 and E2498 for which  $|\mu|$  significantly increases when decreasing ionic strength from 100 mM to about 10 mM, and subsequently levels off for concentrations lower than 10 mM. Analysis of the data was carried out according to a methodology detailed elsewhere [65] on the basis of the theory outlined in previous section. For that purpose, the length scale associated to the thickness of surface appendage and/or cell wall was estimated from nanomechanical AFM analysis of the bacteria in 1 mM  $\text{KNO}_3$  solution, *i.e.* from the spatial range where non-linearity between loading force and nano-indentation applies, thus providing  $d \sim 25$  nm for E2152,  $d \sim 40$  nm for E2498 and  $d \sim 100$  nm for E2146 and E2302. It is indeed under such low



**Figure 6. Electrophoretic mobility of the bacteria.** Electrophoretic mobility versus  $\text{KNO}_3$  salt concentration as measured for E2152, E2146, E2302, and E2498 strains (indicated). Solution pH  $\sim 6.6$ . doi:10.1371/journal.pone.0020066.g006

ionic strength conditions that deformation of the very bacterial soft component upon compression/indentation by the AFM tip is least impeded by a possible concomitant deformation of bulk cytoplasm [65]. This important element, further commented in the Discussion section, is supported by the large Turgor pressure of the cells obtained in 1 mM solution as compared to that determined in 100 mM salt concentration, in line with results and observations by Gaboriaud *et al.* [65]. Analysis of the data are given in **Fig 7** for each strain, recalling that the electrokinetic parameters  $\rho_0$  (expressed below as a volume concentration of charges) and  $\lambda_0$  are jointly determining the slope and magnitude of the mobility as a function of ionic strength in the high salt concentration regime, while interphasial heterogeneity of the bacterium (parameter  $\alpha$ ) may further come into play at sufficiently low ionic strengths as a result of possible swelling of the cell wall/surface appendage. The reader is referred to [68] for further details. The legend of **Fig 7** collects the magnitude of the electrokinetic parameters obtained for the various bacteria, having in mind that values are given with a precision of  $\pm 10\%$ , in relation with the error bars of experimental data. Remarkably, data for the reference bacteria E2152 could be reproduced by theory over the whole range of ionic strength examined in this study. The charge density for this strain is high ( $\rho_0 = -170$  mM) as compared to that obtained for other gram-negative bacteria like *Shewanella* [65] and is in good agreement with that determined by Sanohara *et al.* for *E. coli* [101]. The analysis suggests that it is not necessary to introduce any interphasial heterogeneity of the bacteria for adequately reproducing electrokinetic behavior at low ionic strengths. The rate of increase of  $|\mu|$  upon decrease of ionic strength may be indeed solely attributed to a significant polarization of the electric double layer around/within the bacteria, as expected for such large values of charge density [68]. Also, an hydrodynamic penetration length  $1/\lambda_0$  of about 0.7 nm is determined, which denotes a poor intrusion of the electroosmotic flow within the thin cell wall that serves as only soft component for the reference strain devoid of type 1 *fimbriae*, *F-pili* or Ag43 protein. For bacteria with type 1 *fimbriae* (E2146), we obtain significantly lower charge density ( $\rho_0 = -30$  mM) and larger hydrodynamic penetration length ( $1/\lambda_0 = 1.7$  nm) than for the E2152 strain. This indicates that the charges responsible for the motion of the particles upon action of the electric field are either present in lower number or distributed over larger volume than for E2152 cells and that the supporting soft structure is significantly permeable, *i.e.* inhibits flow penetration to a lower extent than within the cell wall surrounding the reference bacteria E2152. Additionally, mobility values for ionic strengths lower than  $\sim 20$  mM are compatible with an increase of  $\alpha$ , *i.e.* a heterogeneous extension of the bacterial appendage by electrostatically-driven swelling processes connected to repulsive interactions between neighboring charges carried by the fimbriae. For the E2498 strain covered by Ag43 protein layer, electrokinetic data are excellently reproduced in the ionic strength range 5 mM to 100 mM adopting the values  $\rho_0 = -170$  mM and  $1/\lambda_0 = 0.6$  nm. For lower ionic strengths, the slight decrease in  $|\mu|$  with decreasing ionic strengths is interpreted by a swelling of the outer edge of the protein layer, as judged by the increase in length scale  $\alpha$  that allows the recovering of data points collected at  $\text{KNO}_3$  concentrations lower than 5 mM. Similarly to E2152, the set of electrokinetic parameters ( $\rho_0$ ,  $\lambda_0$ ) obtained for E2498 typically pertains to a soft structure that is rather compact, highly charged, and poorly permeable. Finally, despite the proven presence of *F-pili* at the surface of E2302 strain, the dependence and magnitude of  $|\mu|$  with ionic strength depicts features that are surprisingly similar to those obtained for the strain E2498. It was systematically



**Figure 7. Electrokinetic analysis of the bacterial electrophoretic mobilities.** Quantitative analysis of the electrokinetic patterns of (A) E2152, (B) E2146, (C) E2302, (D) E2498. The charge density  $\rho_0$ , the characteristic flow penetration length  $1/\lambda_0$ , the heterogeneity length scale  $\alpha$  and the thickness  $d$  of the soft bacterial component are indicated below. (A) E2152:  $d=25\text{nm}$ .  $\rho_0=-170\text{mM}$ ,  $1/\lambda_0=0.7\text{nm}$ ,  $\alpha\rightarrow 0$ . (B) E2146:  $d=100\text{nm}$ .  $\rho_0=-30\text{mM}$ ,  $1/\lambda_0=1.7\text{nm}$ , (curve a)  $\alpha\rightarrow 0$ , (curve b)  $\alpha=2\text{nm}$ , (curve c)  $\alpha=5\text{nm}$ , (curve d)  $\alpha=7\text{nm}$ . (C) E2302:  $d=25\text{nm}$ .  $\rho_0=-160\text{mM}$ ,  $1/\lambda_0=0.7\text{nm}$ , (curve a)  $\alpha\rightarrow 0$ , (curve b)  $\alpha=1\text{nm}$ , (curve c)  $\alpha=2\text{nm}$ , (curve d)  $\alpha=3\text{nm}$ . (D) E2498:  $d=40\text{nm}$ .  $\rho_0=-170\text{mM}$ ,  $1/\lambda_0=0.6\text{nm}$ , (curve a)  $\alpha\rightarrow 0$ , (curve b)  $\alpha=1\text{nm}$ , (curve c)  $\alpha=2\text{nm}$ , (curve d)  $\alpha=3\text{nm}$ . N.B.: Values for  $\rho_0$  and  $1/\lambda_0$  are indicated with a precision of  $\pm 10\%$  in relation with error bars of experimental data.  
doi:10.1371/journal.pone.0020066.g007

verified that an analysis taking into account a thickness  $d\sim 100\text{nm}$  for these F-pili rendered impossible any appropriate fit of the data at large ionic strengths and further systematically required a charge density and hydrodynamic penetration length of magnitudes  $\rho_0\sim -160\text{mM}$ ,  $1/\lambda_0\sim 0.6\text{nm}$  that mark the presence of compact soft structures (see values derived for E2152 and E2498) rather than that of the expected long, flexible filaments (see values obtained for E2146). An explanation for this counterintuitive result is inferred upon closer inspection of the AFM images detailed in Fig 3. Indeed, in the case of E2146, type 1 fimbriae clearly constitute a continuous polymeric layer surrounding the cell membrane whereas for E2302, the number of observed F-pili is extremely low (to a maximum of 5) and by no means may be assimilated to a polymeric layer of which electrohydrodynamic properties can be tackled on the basis of a mean field model. In other words, the quantities  $\rho_0$  and  $1/\lambda_0$  derived for E2302 suggest

that the electrokinetic properties for these bacteria are mainly governed by the cell membrane supporting the F-pili rather than by the F-pili themselves which are either too scarce for generating any predominant contribution to the overall mobility of the bacteria, or completely retracted along the cell wall, thereby covering heterogeneously an insignificant spatial fraction of the overall bacterial surface. This is supported by the excellent quantitative recovering of the electrokinetic data for E2302 at ionic strengths larger than 10 mM, taking for the cell surface appendage thickness the value  $d\sim 25\text{nm}$ , *i.e.* that associated to the cell wall thickness for the reference strain E2152. For salt concentration below 10 mM, data measured for E2302 are further in line with a heterogeneous extension of the bacterial soft interphase, which is probably associated to a stretching of the few F-pili surrounding the cell and/or that of the supporting cell membrane.

For the strain E2146, the electrokinetic analysis points out a value of the dimensionless parameter  $1/\lambda_0$  which is about 50 times lower than the typical thickness  $\sim 100$  nm of the fimbriae layer. Additionally, within the salt concentration range of interest in this study, the fimbriae layer thickness is much larger than the Debye layer thickness, classically denoted as  $\kappa^{-1}$ . These elements indicate that for the E2146 strain, the electroosmotic flow solely probes the charges located at the outer edge of the soft component of the bacteria with as a result an insignificant contribution of charges located within the supporting cell wall. Such reasoning is in line with the observation by Duval et al. [102] on the electrokinetic features of fibrillated *S. Salivarius* of which electrophoretic mobility is determined by the outer corona of the fibrils only, and is further supported by numerical simulations performed according to the electrokinetic formalism for soft multi-layered bioparticles adapted for cylindrical geometry [79] (not shown) (and see review in [70]). For the strain E2498, the electrohydrodynamic analysis discussed above was carried out taking an overall soft layer thickness of  $\sim 40$  nm as inferred from AFM mechanical results. This layer however encompasses not only the Ag43 protein layer but also the cell wall which is about 25 nm thick, as judged from AFM results obtained for the reference strain E2152. Consequently, the thickness for the only Ag43 protein layer is about 15 nm, in good agreement with values reported in the literature [70]. The important feature is that the typical dimension of this layer is of the order of  $\kappa^{-1}$  in 1 mM salt concentration. As a result, ignoring the two layer-structure for the soft component of E2498 and assimilating it to a single component within electrokinetic analysis, may lead to erroneous estimation of the local electrostatic potential distribution all across the soft interphase, and thus misinterpretation of the electrophoretic mobility. In view of the separate determination of the thicknesses of cell wall and Ag43 protein layer and further recalling that electrokinetic features of the only cell wall are known from analysis of mobility data collected for E2152, we therefore refined our interpretation of results depicted in **Fig 7D** for E2498 by amending the electrokinetic formalism for soft multi-layered bioparticles developed in spherical geometry [79] to the case of cylindrical particles. Along this line, the soft component of E2498 now consists of two layers, the cell wall of known thickness and charge density ( $\rho_0 = -170$  mM), and the 15 nm thick Ag43 protein layer for which  $\rho_0$  and flow penetration degree  $1/\lambda_0$  are to be determined. Corresponding results are essentially identical to those obtained by assimilating the two-layer structure of E2498 to a single shell basically because the charge density as retrieved for the Ag43 protein layer is fortuitously of the same order of magnitude than that derived for the cell wall only (based on analysis of E2152).

## Discussion

### On the relationships between nature of bacterial external structures, their mechanical elasticity and electrohydrodynamic properties

In this work, the electrokinetic and elastic properties of *E. coli* interphases are determined by electrokinetic and AFM nanomechanical analyses. The investigation is carried out for four bacterial strains that differ according to the presence/absence and nature of surface appendages as detailed in **Table 1**.

For sufficiently large electrolyte concentrations, the repulsive electrostatic interactions between neighboring charged sites within the soft parts of the bacteria are screened. Attractive segment-segment interactions therefore lead to collapse of the associated gel-like structure of the appendage/cell wall surrounding the bacteria. Under these conditions, the electrokinetic signature of all

bacteria can be satisfactorily interpreted by considering the soft surface layer as homogeneous ( $\alpha \rightarrow 0$ ). More in details, electrophoretic mobility measured for the reference bacteria E2152 are quantitatively explained taking a charge density  $\rho_0 \sim -170$  mM and a hydrodynamic penetration length  $1/\lambda_0 \sim 0.7$  nm. These values reflect the electrohydrodynamic features of the cell wall which is further characterized by an important Young Modulus (950 kPa). This extreme mechanical rigidity of the cell wall, as compared to that of other appendages carried by the mutant bacteria, agrees with the absence of swelling for the cell wall over the whole range of ionic strengths 0.5–100 mM examined by electrokinetics. Indeed, the degree of swelling for a given charged polymeric layer is subject at equilibrium to the condition of zero net osmotic pressure  $\Pi = 0$ , where  $\Pi$  contains an entropic contribution,  $\Pi_{\text{mix}}$ , related to polymer-solvent mixing, an electrostatic contribution  $\Pi_{\text{elec}}$  determined by the charge density  $\rho_0$ , and an elastic contribution  $\Pi_{\text{elastic}}$  which is intrinsically governed by the rigidity of the polymer chains. For E2152, the rigidity of the cell wall prevents from significant swelling despite the large volume charge density determined for the soft part of this bacterium. Additionally, the compact and rigid character of the cell wall is supported by a sub-nanometric electroosmotic flow penetration as subsumed in the quantity  $1/\lambda_0$ . For the sake of comparison, values as large as  $1/\lambda_0 \sim 2\text{--}4$  nm were obtained for *Shewanella* bacterial strains [65] or other highly permeable bioparticles like viruses [79]. In case of E2498 strain with the Ag43 protein layer at the surface, swelling takes place for salt concentrations below  $\sim 5$  mM, as indicated by the corresponding increase of the parameter  $\alpha$ . Because the charge density obtained for E2498 is of the same order of magnitude than that determined for the reference strain, this result suggests that the Ag43 protein layer is more flexible, less rigid than the cell wall component, thus allowing for layer extension as driven by the repulsive interactions between neighboring charged chains. This is confirmed by AFM analysis of the mechanical properties of E2498, which indicates a Young modulus that is about 30% lower than that for E2152. The electrokinetic and mechanical features of the mutant bacteria E2146 covered by the type 1 *fimbriae* considerably differ from those obtained for E2152 and E2498. The charge density and Young modulus obtained for the E2146 strain are indeed  $\sim 6$  and  $\sim 2\text{--}3$  times lower as compared to values collected for E2152 and E2498, while the typical flow penetration length is about  $\sim 2.5$  times larger. These comparisons clearly indicate the loose structure of the fimbriae layer, its resulting larger permeability with, in turn, a significant layer swelling at salt concentrations below  $\sim 20$  mM. Finally, the electrophoretic features of E2302 resemble those of E2498 and E2152 at least in the high ionic strength regime, mainly because the presence of few *F-pili* and their discontinuous positioning at the bacterial surface, as imaged by AFM, do not lead to a significant contribution to the overall mobility of the bacterium which is instead determined by the electrohydrodynamic properties of the supporting cell wall. However, the nanomechanical softness of E2302 bacterial interphase seems to be mainly controlled by the very loose *F-pili*, even if those are present at a very low density. This is inferred from the low value of the Young modulus ( $\sim 500$  kPa) obtained for this strain, which is about 50% lower than that determined for the reference E2152 strain. Such sensitivity of the AFM mechanical analysis to the presence of a few surface appendages only is explained by the low spring constant chosen for the AFM tip, thus allowing for refined local measurements over a few  $\text{nm}^2$  spatial resolution while electrophoresis should be rather considered as a technique yielding averaged information over the whole surface area of the bacteria.

### On the response of *E. coli* bacteria on osmotic stress, effects on cell spring constant (or equivalently inner Turgor pressure)

The AFM and electrokinetic data discussed above demonstrate the key roles played by mechanical rigidity and volume charge density of cell wall and surface appendages in determining their propensity to swell upon lowering ionic strength. With regard to the inner Turgor pressure of the cells that is accessible by AFM only, we found that under 1 mM salt concentration condition, it decreases appreciably with the presence of external polymeric filaments like type 1 *fimbriae* and *F-pili*. On the contrary, in 100 mM salt concentration, regardless of the presence and nature of surface appendage, the Turgor pressure remains roughly identical for all strains and is systematically lower in magnitude than that determined in the low ionic strength regime. It is known that bacteria respond to changes in the osmolarity of their environment by regulating their Turgor pressure through exoosmotic water release [103]. Our results show that the presence of loose, flexible surface appendage around the bacteria under low electrolyte concentration condition acts as a protective barrier, thereby attenuating the impact of changes in extracellular ionic strength and lowering the osmotic pressure constraint. The underlying processes are possibly related to the building up of chemical and ionic gradients within the (swollen) appendage associated-gel layer, with as a result a significant suppression of the osmotic stress exerted on the cytoplasm, thereby lowering the inner Turgor pressure. Another explanation for the dependence of the Turgor pressure on surface appendages is quantitatively provided in **Figs S3–S4** where the reader is referred for details. Basically, the analysis suggests that there is a quantitative correlation between the stretching modulus of the bacterial envelope,  $\lambda$ , and the presence/absence and nature of surface appendage anchored at the cell wall. In details, it is found that  $\lambda$  significantly decreases with the presence of long/flexible appendages (type 1 *fimbriae* and *F-pili*), meaning that these tend to decrease the surface energy of the overall bacterial envelope. Recalling that the Turgor pressure is intrinsically depending on the stretching modulus  $\lambda$  of the bacterial envelope and the cell spring constant (3), the AFM study carried out on the four bacterial strains indicates that the dependence of the Turgor pressure on bacterial surface structures may be accounted for upon arguing the impact of these more or less loose structures on the quantity  $\lambda$  or equivalently on the bacterial surface energy.

In 100 mM salt concentration, where stretching of the surface appendage is less marked and/or insignificant, the range of the non-linear regime in the force indentation curves, supposedly associated to the deformation of the surface appendage, is surprisingly broader than that obtained in 1 mM concentration. As invoked in preceding sections, this feature is attributed to the very low Turgor pressure of the cells as a result of water release, and the high osmotic stress bacteria are facing is not regulated by the presence of any surface appendage as confirmed by the quasi-identical Young moduli obtained for the four bacterial strains examined here (**Histogram S1a**). The picture is basically that of significantly contracted bacteria (which is supported by the study of bacterial morphology, see **Table 1**) due to partial loss of inner water so that the interphase with surrounding medium is rendered very elastic or flexible, as confirmed by the low values of Young moduli (**Histogram S1a**). Consequently, upon compression of the AFM tip onto the bacteria, the deformation concerns not only the bacterial soft component but also the elastic cytoplasm volume. This leads to a misleading interpretation when attributing the non-

linear mechanical behaviour to the compression of the surface appendage and/or cell wall only.

### Conclusion

In this paper, we report a systematic analysis of the nanomechanical properties (Young modulus, inner Turgor pressure) and electrokinetic features (electroosmotic flow penetration length scale and volume charge density) for four *E. coli* bacterial strains expressing or not the surface appendages type 1 *fimbriae*, type-F *pili* or Ag43 protein layer. It is found that bacterial elasticity and inner Turgor pressure strongly decrease in the presence of loose surface filaments under conditions of low medium ionic strength (1 mM) while these properties remain roughly identical in 100 mM salt concentration where exoosmotic water loss and bacterial contraction are most significant. A qualitative connection is made between the rigidity of the bacterial interphase and their swelling features upon lowering ionic strength, thereby pointing out the concomitant importance of the charge density they carry together with their intrinsic elasticity in governing the degree of interphase extension. It is further shown how the electrophoretic patterns (mobility *versus* ionic strength) are correlated to the presence/absence, nature of the surface appendages carried by the bacteria, in excellent agreement with the expected genotypes and phenotypes of the bacteria and their imaging by AFM.

In forthcoming studies, the here-reported static analysis of the electrokinetic and nanomechanical properties of the four *E. coli* bacterial strains will be extended by a dynamic investigation where bacteria will be subjected to electric and mechanical frequency-dependent stimulations. It is believed that the complete set of physico-chemical data collected for these bacteria with known interphasial structures, will then allow for a quantitative understanding of their adhesion features onto substrates with well-controlled surface chemistry.

### Supporting Information

**Figure S1 Force curves recorded for the strain E2152 (4 graphs on the left) and for the strain E2302 (4 graphs on the right) with experimental data marked by the open symbols (pink), Hertz expression by the solid blue curve and exponential regression by the solid red line at 1 mM (panels A and C) and 100 mM (panels B and D) KNO<sub>3</sub> concentration.** The plots depicted in panels C and D are zooms of the data points within the onset of the non-linear regime as materialized by the windows given in panels A and B. (EPS)

**Figure S2 Force curves recorded for the strain E2146 (4 graphs on the left) and for the strain E2498 (4 graphs on the right) with experimental data marked by the open symbols (pink), Hertz expression by the solid blue curve and exponential regression by the solid red line at 1 mM (panels A and C) and 100 mM (panels B and D) KNO<sub>3</sub> concentration.** The plots depicted in panels C and D are zooms of the data points within the onset of the non-linear regime as materialized by the windows given in panels A and B. (EPS)

**Figure S3 Bacterial spring constant as a function of Turgor pressure for stretching moduli of the bacterial envelope fixed at values of 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 and 0.40 N/m.** The dashed horizontal line corresponds to the kcell value obtained by AFM for the E2152 strain in 1 mM KNO<sub>3</sub> electrolyte concentration. (EPS)

**Figure S4 Bacterial spring constant in 1 mM KNO<sub>3</sub> electrolyte concentration as a function of Turgor pressure.** The curves correspond to computations performed with the minimum stretching moduli (indicated)  $\lambda_{\min}$  which allow retrieving of the experimentally determined  $k_{\text{cell}}$  for E2152, E2146, E2302 and E2498 bacteria. (EPS)

**Table S1 Phenotypic assays to validate the constructed strains.** (DOCX)

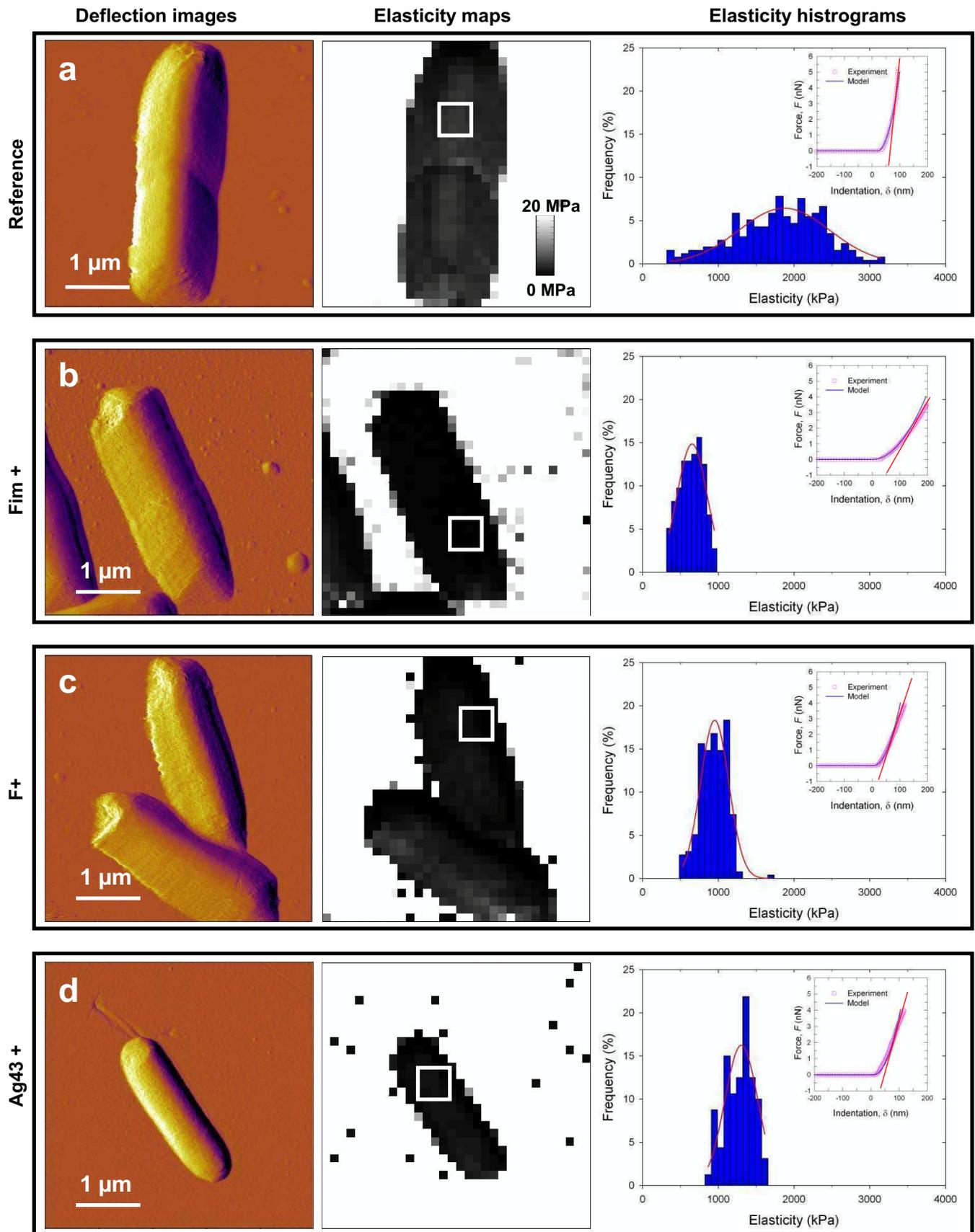
**Histogram S1 Variations of mechanical properties for each bacterial structures.** a) Elastic modulus (or Young modulus) in 1 mM and 100 mM KNO<sub>3</sub> solution. b) Bacterial spring constant in 1 mM and 100 mM KNO<sub>3</sub> solution. c) Turgor pressure in 1 mM and 100 mM KNO<sub>3</sub> solution. † Elasticity and bacterial spring constant are averages calculated from 1024 force curve measurements. ‡ Turgor pressure estimations were done according to the equation  $k_{\text{cell}} = \frac{3}{2} \pi p a \frac{K_1(\rho^*)}{K_0(\rho^*)}$  where  $p$  is the Turgor pressure,  $a$  the bacterium radius (~500 nm),  $K_0$  and  $K_1$  are modified Bessel functions of the second type of order 0 and 1, respectively.  $\rho^*$  stands for the reduced curvature radius defined by  $\rho^* = \rho \left[ \frac{3pR^3}{4(\lambda - pR)} \right]^{-1/2}$  with  $\rho$  the cantilever tip radius

## References

- Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 181: 4725–4733.
- Beveridge TJ (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol* 72: 229–317.
- Amako K, Murata K, Umeda A (1983) Structure of the envelope of *Escherichia coli* observed by rapid-freezing and substitution fixation method. *Microbiology and Immunology* 27: 95–99.
- Huang KC, Mukhopadhyay R, Wen BN, Gitai Z, Wingreen NS (2008) Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 19282–19287.
- Obara M, Nakae T (1992) Porin of *Pseudomonas aeruginosa* forms low conductance ion channel in planar lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186: 645–651.
- Lyon GJ, Novick RP (2004) Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25: 1389–1403.
- Gally D, Bray K, Cooper S (1993) Synthesis of peptidoglycan and membrane during the division cycle of rod-shaped, Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 175: 3121–3130.
- Paranchych W, Frost LS (1988) The physiology and biochemistry of *pili*. *Advances in Microbial Physiology* 29: 53–114.
- Emerson RJT, Camesano TA (2004) Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to a biomaterial. *Appl Environ Microbiol* 70: 6012–6022.
- Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R (2000) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* 37: 424–432.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, et al. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48: 1511–1524.
- Da Re S, Le Quere B, Ghigo JM, Beloin C (2007) Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3391–3403.
- Ledeboer NA, Jones BD (2005) Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica serovar typhimurium* on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *Journal of Bacteriology* 187: 3214–3226.
- Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Romling U, et al. (2007) Roles of *curli*, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *Bmc Microbiology* 7: 9.
- Beloin C, Roux A, Ghigo J (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 249.
- Sun H, Zusman DR, Shi WY (2000) Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. *Current Biology* 10: 1143–1146.
- McBride MJ (2001) Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Review of Microbiology* 55: 49–75.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology* 57: 249–273.
- Craig L, Pique ME, Tainer JA (2004) Type IV *pilus* structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2: 363–378.
- Ulett GC, Valle J, Beloin C, Sherlock O, Ghigo JM, et al. (2007) Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and Immunity* 75: 3233–3244.
- Mabbett AN, Ulett GC, Watts RE, Tree JJ, Totsika M, et al. (2009) Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 299: 53–63.
- Thwaites JJ, Mendelson NH (1985) Biomechanics of bacterial walls: studies of bacterial thread made from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 2163–2167.
- Thwaites JJ, Mendelson NH (1991) Mechanical-Behavior of Bacterial-Cell Walls. *Advances in Microbial Physiology* 32: 173–222.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, Spain EM, Nunez ME (2008) Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of *Escherichia coli* ZK1056 prey cells during predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Langmuir* 24: 8102–8110.
- Belas R, Simon M, Silverman M (1986) Regulation of lateral flagella gene-transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 167: 210–218.
- Csonka LN (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic-stress. *Microbiological Reviews* 53: 121–147.
- Bartlett D, Wright M, Yayan AA, Silverman M (1989) Isolation of a gene regulated by hydrostatic-pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* 342: 572–574.
- Chemeris NA, Fikhte BA (1979) Results of measuring the modulus of elasticity of microorganism cell walls. *Mikrobiologiya* 48: 99–101.
- Ubbink J, Schar-Zammaretti P (2005) Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques. *Micron* 36: 293–320.
- Ubbink J, Schar-Zammaretti P (2007) Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 263–270.
- Vadillo-Rodriguez V, Beveridge TJ, Dutcher JR (2008) Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* 190: 4225–4232.
- Schar-Zammaretti P (2002) Surface morphology, elasticity and interactions of lactic acid bacteria studied by atomic force microscopy. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 224: U397–U397.
- Dufréne YF, Boonaert CJP, van der Mei HC, Busscher HJ, Rouxhet PG (2001) Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 86: 113–120.
- Dufréne YF (2008) Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat Rev Microbiol* 6: 674–680.
- Francius G, Tesson B, Dague E, Martin-Jezequel V, Dufréne YF (2008) Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environ Microbiol* 10: 1344–1356.

37. Francius G, Lebeer S, Alsteens D, Wildling L, Gruber HJ, et al. (2008) Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano* 2: 1921–1929.
38. Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrene YF (2008) Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin. *Journal of Bacteriology* 190: 7904–7909.
39. Touhami A, Jericho MH, Boyd JM, Beveridge TJ (2006) Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by using atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* 188: 370–377.
40. Schmid T, Burkhard J, Yeo BS, Zhang WH, Zenobi R (2008) Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms I: imaging of biological nanostructures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391: 1899–1905.
41. Meincken A, Holroyd DL, Rautenbach M (2005) Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4085–4092.
42. Mortensen NP, Fowlkes JD, Sullivan CJ, Allison DP, Larsen NB, et al. (2009) Effects of Colistin on Surface Ultrastructure and Nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* Cells. *Langmuir* 25: 3728–3733.
43. Cross SE, Kreth J, Zhu L, Qi FX, Pelling AE, et al. Atomic force microscopy study of the structure-function relationships of the biofilm-forming bacterium *Streptococcus mutans*; 2005 Jul 20-22; Marina del Rey, CA: Iop Publishing Ltd, S1–S7.
44. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, et al. (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282: 1494–1497.
45. Van der Woude MW, Henderson IR (2008) Regulation and Function of Ag43 (Flu). *Annual Review of Microbiology* 62: 153–169.
46. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85: 11–19.
47. Ghigo JM (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412: 442–445.
48. Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili. *Molecular Microbiology* 30: 285–293.
49. Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38: 113–116.
50. Chaverche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research* 28: n° 22e97.
51. Korea CG, Badourly R, Prévost MC, Ghigo JM, Beloin C (2010) *E. coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher *fimbriae* with distinct surface specificities. *Environmental Microbiology* 12: 1957–1977.
52. Roux A, Beloin C, Ghigo JM (2005) Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: Application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *Journal of Bacteriology* 187: 1001–1013.
53. Mol O, Oudega B (1996) Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 25–52.
54. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Seibel P, Glockshuber R, et al. (2002) Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* 323: 845–857.
55. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Yasuoka MO, Akaza H, et al. (2002) Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 33: 23–26.
56. Klemm P, Christiansen G (1987) Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* 208: 439–445.
57. Reisner A, Haagensen JAJ, Schembri MA, Zechner EL, Molin S (2003) Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology* 48: 933–946.
58. Wu XR, Sun TT, Medina JJ (1996) In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uropalins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9630–9635.
59. Wang YA, Yu X, Silverman PM, Harris RL, Egelman EH (2009) The Structure of F-Pili. *Journal of Molecular Biology* 385: 22–29.
60. Silverman PM (1997) Towards a structural biology of bacterial conjugation. *Molecular Microbiology* 23: 423–429.
61. Dionisio F, Matic I, Radman M, Rodrigues OR, Taddei F (2002) Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics* 162: 1525–1532.
62. Jacobson A (1972) Role of F-pili in penetration of bacteriophage  $\Phi$ . *Journal of Virology* 10: 835–843.
63. Caffrey P, Owen P (1989) Purification and N-terminal sequence of the  $\alpha$ -subunit of antigen-43, a unique protein complex associated with the outer-membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171: 3634–3640.
64. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, et al. (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301: 105–107.
65. Gaboriaud F, Gee ML, Strugnelli R, Duval JFL (2008) Coupled Electrostatic, Hydrodynamic, and Mechanical Properties of Bacterial Interfaces in Aqueous Media. *Langmuir* 24: 10988–10995.
66. Ohshima H (1995) Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science* 62: 189–235.
67. Duval JFL (2007) Electrophoresis of soft colloids: basic principles and applications. In: Wilkinson KI, Lead J, eds. *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterization*. pp 315–344.
68. Duval JFL, Ohshima H (2006) Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 22: 3533–3546.
69. Hyono A, Gaboriaud F, Mazda T, Takata Y, Ohshima H, et al. (2009) Impacts of papain and neuraminidase enzyme treatment on electrohydrodynamics and IgG-mediated agglutination of type A red blood cells. *Langmuir* 25: 10873–10885.
70. Duval JFL, Gaboriaud F (2010) Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15: 184–195.
71. Stuart MAC, Waajen F, Dukhin SS (1984) Electrokinetic effects of adsorbed neutral polymers. *Colloid and Polymer Science* 262: 423–426.
72. Stuart MAC, Mulder JW (1985) Adsorbed polymers in aqueous-media: the relation between potential, layer thickness and ionic-strength. *Colloids and Surfaces* 15: 49–55.
73. Ascher U, Christiansen J, Russell RD (1981) Collocation Software for Boundary-value odes. *Acm Transactions on Mathematical Software* 7: 209–222.
74. Ohshima H (1997) Electrophoretic mobility of cylindrical soft particles. *Colloid and Polymer Science* 275: 480–485.
75. Ohshima H (2001) On the electrophoretic mobility of a cylindrical soft particle. *Colloid and Polymer Science* 279: 88–91.
76. Ohshima H (2003) Electrophoretic mobility of a charged cylindrical colloidal particle covered with an ion-penetrable uncharged polymer layer. *Journal of Colloid and Interface Science* 258: 252–258.
77. Clements A, Gaboriaud F, Duval JFL, Farn JL, Jenney AW, et al. (2008) The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One* 3: e3817.
78. Shamrock VJ, Duval JFL, Lindsey GG, Gaboriaud F (2009) The role of the heat shock protein Hsp12p in the dynamic response of *Saccharomyces cerevisiae* to the addition of Congo red. *FEMS Yeast Research* 9: 391–399.
79. Langlet J, Gaboriaud F, Gantzer C, Duval JFL (2008) Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* 94: 3293–3312.
80. Viota JL, Mandal S, Delgado AV, Toca-Herrera JL, Möller M, Zanuttin F, et al. (2009) Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *Journal of Colloid and Interface Science* 332: 215–223.
81. Lévy R, Maaloum M (2002) Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology* 13: 33–37.
82. Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, Norde W, De Vries J, Dijkstra RJB, et al. (2004) Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5441–5446.
83. Polyakov P, Soussen C, Duan J, Duval JFL, Brie D. Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples Francius G. *PLoS One*, In press.
84. Boulbitch AA (1998) Deflection of a cell membrane under application of a local force. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 57: 2123–2128.
85. Boulbitch A (2000) Deformation of the envelope of a spherical gram-negative bacterium during the atomic force microscopic measurements. *J Electron Microsc (Tokyo)* 49: 459–462.
86. Arnoldi M, Fritz M, Bauerlein E, Radmacher M, Sackmann E, et al. (2000) Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 62: 1034–1044.
87. Sneddon IN (1965) The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* 3: 47–57.
88. Hertz H (1881) Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die Reine und angewandte Mathematik* 92: 156–171.
89. Francius G, Hemmerle J, Ball V, Lavalle P, Picart C, et al. (2007) Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *Journal of Physical Chemistry C* 111: 8299–8306.
90. Gaboriaud F, Dufrene YF (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces* 54: 10–19.
91. Fan TH, Fedorov AG (2003) Electrohydrodynamics and surface force analysis in AFM Imaging of a charged, deformable biological membrane in a dilute electrolyte solution. *Langmuir* 19: 10930–10939.
92. Pouttu R, Puustinen T, Kukkonen M, Virkola R, Laurila M, et al. (2000) Functional variability of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 485: 63–68.

93. Lawn AM (1966) Morphological features of the *pili* associated with *Escherichia coli* K 12 carrying R factors or the F factor. *Journal of General Microbiology* 45: 377–383.
94. Silverman PM, Clarke MB (2010) New insights into F-pilus structure, dynamics, and function. *Integrative Biology* 2: 25–31.
95. Kajava AV, Cheng N, Cleaver R, Kessel M, Simon MN, et al. (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Molecular Microbiology* 42: 279–292.
96. Dufrière YF (2008) Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nat Protoc* 3: 1132–1138.
97. Pelling AE, Li YN, Shi WY, Gimzewski JK (2005) Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6484–6489.
98. Schaer-Zammaretti P, Ubbink J (2003) Imaging of lactic acid bacteria with AFM - elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 97: 199–208.
99. Boulbitch A, Quinn B, Pink D (2000) Elasticity of the rod-shaped Gram-negative cubacteria. *Physical Review Letters* 85: 5246–5249.
100. Yao X, Jericho M, Pink D, Beveridge T (1999) Thickness and elasticity of gram-negative murein *sacculi* measured by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* 181: 6865–6875.
101. Sonohara R, Muramatsu N, Ohshima H, Kondo T (1995) Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by Electrophoretic Mobility measurements. *Biophysical Chemistry* 55: 273–277.
102. Duval JFL, Busscher HJ, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Norde W (2005) Analysis of the interfacial properties of fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strains from electrophoretic mobility and titration measurements: evidence for the shortcomings of the 'classical soft-particle approach'. *Langmuir* 21: 11268–11282.
103. Marquis RE (1968) Salt-induced contraction of bacterial cell walls. *Journal of Bacteriology* 95: 775–781.



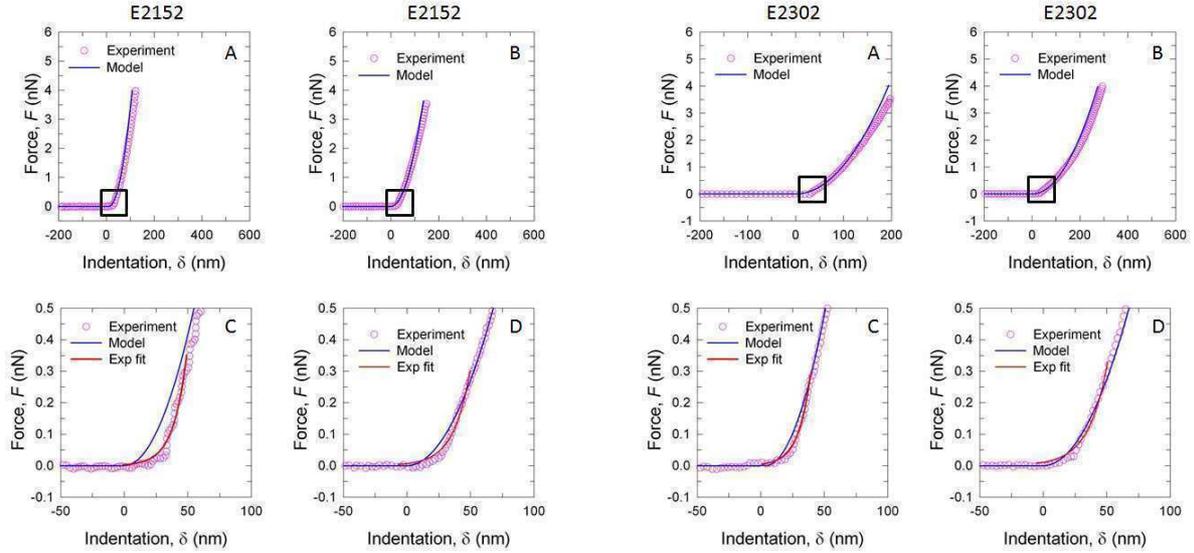
**Figure 4.**

## Supporting Information S1

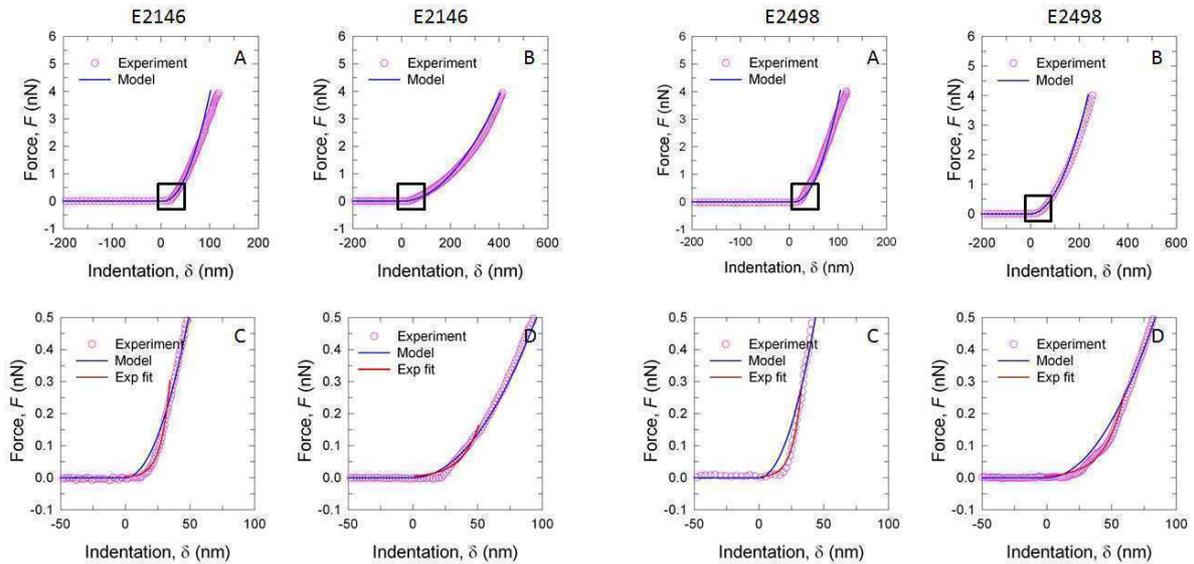
### **On the impact of the electrostatic part of the force curves on the determination of nanomechanical parameters.**

Force measurements were recorded in 1 mM and 100 mM KNO<sub>3</sub> concentrations for the four bacterial strains E2152, E2302, E2146 and E2498 considered in the study. Typical data are given in Figures S1-S2 where the quality of the data fit according to Hertz expression within the non-linear regime of the force curves is highlighted. Additionally, an exponential regression of the data is indicated as an indicator of the role played by electrostatic forces at the onset of the non-linear regime. As judged from the appropriateness of the Hertz expression in reproducing data for very low loading forces (0.1-0.3 nN), the results suggest that electrostatic forces are most operative under low ionic strength condition (1 mM KNO<sub>3</sub> concentration) where screening of the volume charge carried by the bacterial envelop is least screened by ions present in the medium. In addition, it is clear that electrostatic forces are most significant for the E2152 and E2498 strains, *i.e.* those that exhibit the larger volume charge densities  $\rho_0$  as determined independently from electrokinetic analysis. This qualitative result is in line with expectation.

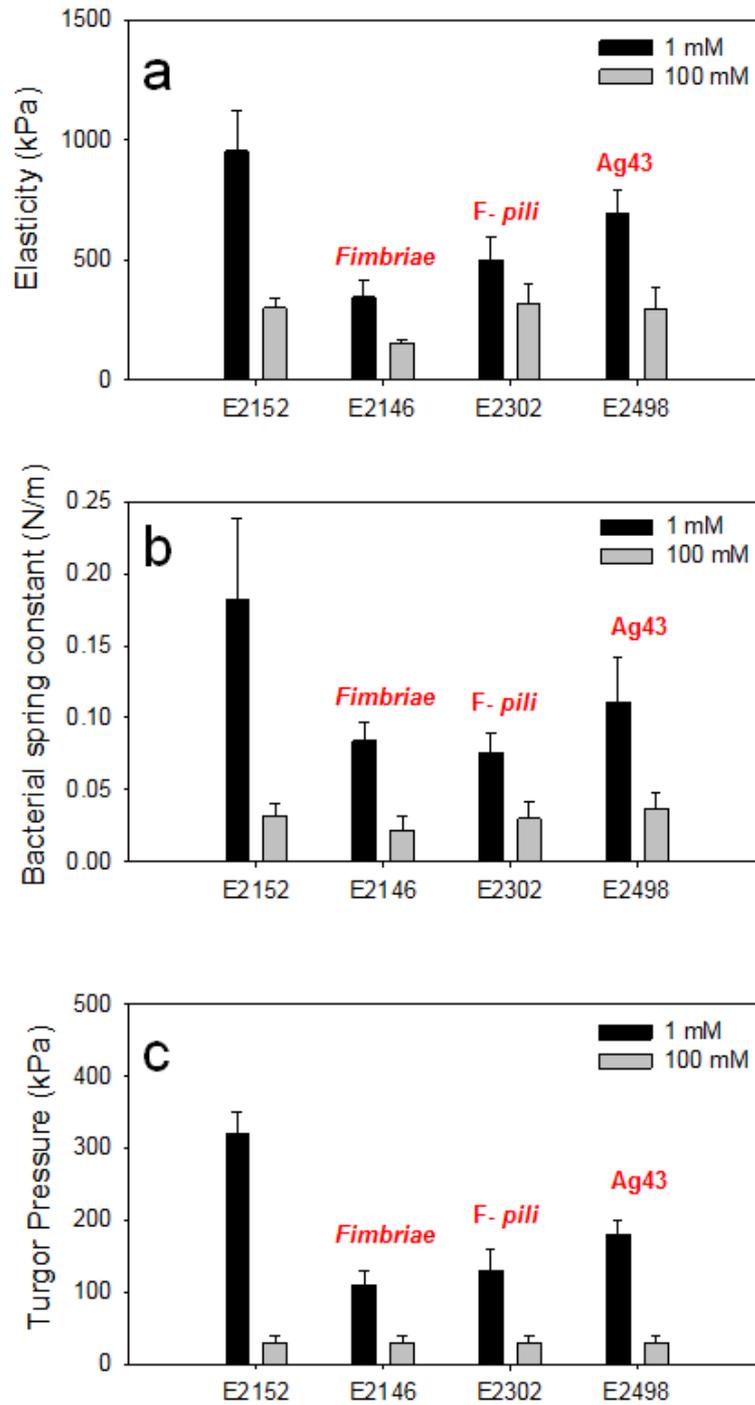
A rigorous determination of the nanomechanical parameters of the bacteria requires excluding from the mechanical analysis of the non-linear regime of the force curves the spatial range where electric double layer repulsion between AFM tip and bacteria is present. This is done upon shifting accordingly the contact point. When doing so, it appears that this shift is negligible as compared to the overall piezo-drive and does not affect to a significant degree the general pattern of the modeled force versus indentation curve. This is further verified upon computation of Young moduli when taking into account the aforementioned shift of the contact point between bacteria and AFM tip as a result of the presence of electrostatic forces.



**Figure S1:** Force curves recorded for the strain E2152 (4 graphs on the left) and for the strain E2302 (4 graphs on the right) with experimental data marked by the open symbols (pink), Hertz expression by the solid blue curve and exponential regression by the solid red line at 1 mM (panels A and C) and 100 mM (panels B and D)  $\text{KNO}_3$  concentration. The plots depicted in panels C and D are zooms of the data points within the onset of the non-linear regime as materialized by the windows given in panels A and B.

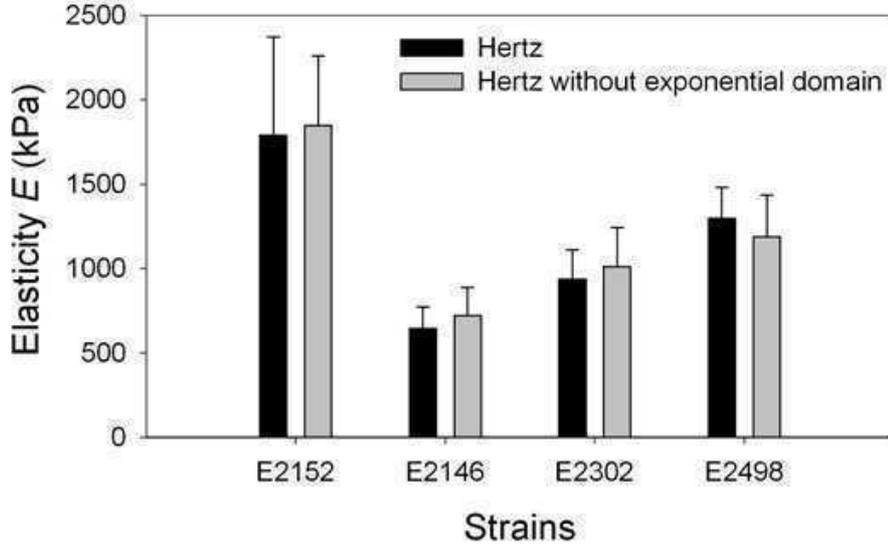


**Figure S2:** Force curves recorded for the strain E2146 (4 graphs on the left) and for the strain E2498 (4 graphs on the right) with experimental data marked by the open symbols (pink), Hertz expression by the solid blue curve and exponential regression by the solid red line at 1 mM (panels A and C) and 100 mM (panels B and D)  $\text{KNO}_3$  concentration. The plots depicted in panels C and D are zooms of the data points within the onset of the non-linear regime as materialized by the windows given in panels A and B.



**Histogram S1:** Variations of mechanical properties for each bacterial structures. a) Elastic modulus (or Young modulus) in 1 mM and 100 mM  $KNO_3$  solution. b) Bacterial spring constant in 1 mM and 100 mM  $KNO_3$  solution. c) Turgor pressure in 1 mM and 100 mM  $KNO_3$  solution.

The results indicate that a slight under-estimation of the elastic modulus of about 1 to 5% (according to the strain) is obtained if including in the mechanical analysis data points located within the electrostatic regime of the force versus separation distance curves (Histogram S2).



**Histogram S2:** Histograms of elasticity of bacterial cell envelopes determined in 1 mM KNO<sub>3</sub> solution according to Hertz model only (black) and according to Hertz model after suppression of the electrostatic part of the force versus separation distance curve (grey).

As an example, we obtained for E2152 strain elastic moduli of 953 kPa and 981 kPa when reasoning on the basis of Hertz model without and with suppression of the part of the force curves reflecting electrostatic double layer repulsion, respectively. The corresponding difference in elastic modulus is for that strain about 3%.

### Evaluation of inner bacterial turgor pressure.

Turgor pressure estimations were done using the implicit equation  $k_{\text{cell}} = \frac{3}{2} \pi p a \frac{K_1(\rho^*)}{K_0(\rho^*)}$

where  $p$  is the Turgor pressure,  $a$  the bacterium radius (~500 nm),  $K_0$  and  $K_1$  are Bessel

functions and  $\rho^*$  the reduced curvature radius defined by  $\rho^* = \rho \left[ \frac{3pR^3}{4(\lambda - pR)} \right]^{-1/2}$  with  $\rho$  the

cantilever tip radius ( $\rho \sim 20$  nm) and  $\lambda$  the stretching modulus of the bacterial envelope (0.10

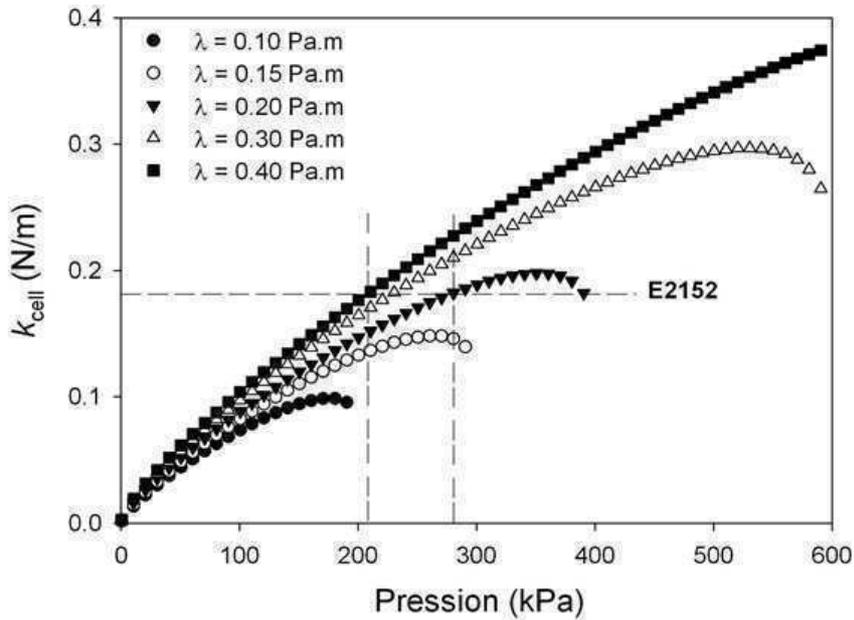
$\leq \lambda \leq 0.2-0.40$  N/m). We have to express the bacterial spring constant (which is obtained from AFM data analysis of the compliance regime) in the form of a parametric function of the turgor pressure

$$k_{cell}(p, \lambda) \approx p \cdot f(p, \lambda) \quad (1)$$

, with  $f(p, \lambda) = \frac{K_1(p, \lambda)}{K_0(p, \lambda)}$  where  $p$  is the searched parameter. To evaluate  $p$ , we fixed the

stretching modulus  $\lambda$  at values of 0.10, 0.20, 0.30 and 0.40 N/m which are in agreement with typical magnitudes reported in literature (Arnoldi *et al.* 2000 and Boulebitch 2000, complete references are given in the main text).

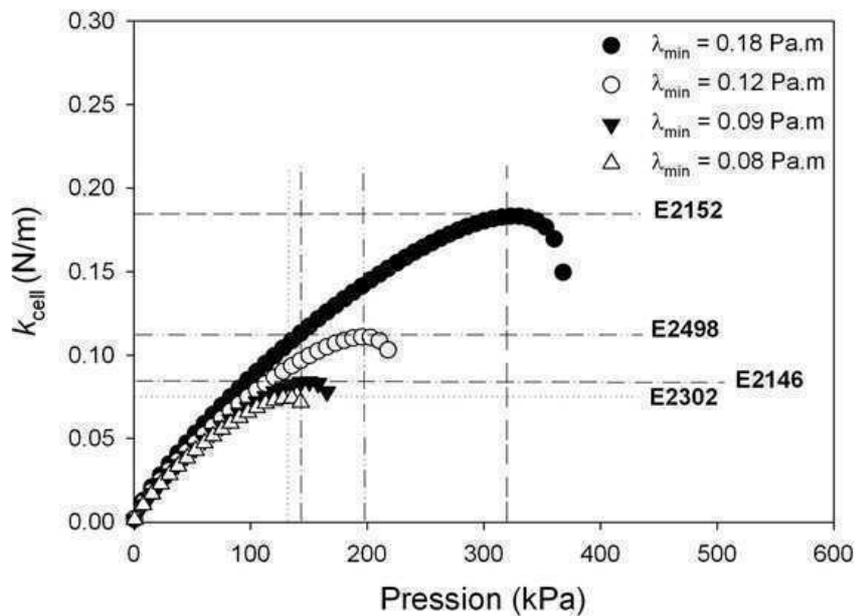
For low bacterial spring constants  $k_{cell}$ , the stretching modulus poorly impacts the Turgor pressure,  $p$ , whereas for larger  $k_{cell}$ , the stretching modulus  $\lambda$  significantly governs the magnitude of  $p$  (Figure S3).



**Figure S3:** Bacterial spring constant as a function of Turgor pressure for stretching moduli of the bacterial envelope fixed at values of 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 and 0.40 N/m. The dashed horizontal line corresponds to the  $k_{cell}$  value obtained by AFM for the E2152 strain in 1 mM  $KNO_3$  electrolyte concentration.

On the basis of the parametric curves plotted in Figure S3, it is possible to obtain the Turgor pressure of the bacterial strains of interest in the study recalling that the  $k_{cell}$  values are known

from analysis of the compliance region in the force *versus* indentation curves. For the sake of illustration, the case of the E2152 strain in 1 mM KNO<sub>3</sub> concentration is treated in Figure S3. It is clear that the parametric curves computed for realistic values of  $\lambda$  adequately reproduce the experimentally determined  $k_{\text{cell}}$  for  $\lambda > 0.15$  N/m. More precise computations indicate that the minimum value required for reproducing  $k_{\text{cell}}$  of E2152 strain in 1 mM KNO<sub>3</sub> electrolyte solution is  $\lambda = 0.18$  N/m. Assuming that the quantity  $\lambda$  is indicative of the surface energy of the bacterial envelope, we may postulate on the basis of thermodynamic arguments that a good approximation for  $\lambda$  corresponds to the minimum value (*e.g.* minimum bacterial surface energy) that allows for retrieving the measured bacterial spring constant. Following such a strategy, it is then possible to estimate  $\lambda$  for the four bacterial strains E2152, E2498, E2302 and E2146. This is illustrated in Figure S4 where the parametric curves in agreement with the  $k_{\text{cell}}$  values of each strain are depicted. The corresponding (minimum) values of  $\lambda$  are also indicated.



**Figure S4:** Bacterial spring constant in 1 mM KNO<sub>3</sub> electrolyte concentration as a function of Turgor pressure. The curves correspond to computations performed with the minimum stretching moduli (indicated)  $\lambda_{\text{min}}$  which allow retrieving of the experimentally determined  $k_{\text{cell}}$  for E2152, E2146, E2302 and E2498 bacteria

From Figure S4, the dependence of the quantity  $\lambda$  on the type of strain is evidenced. This dependence suggests that  $\lambda$  decreases for bacterial envelopes covered with polymeric appendages (strains E2146 and E2302), meaning that the presence of such flexible surface appendages tends to decrease the surface energy of the bacterial envelope.

### **Bacterial strains**

The four strains analyzed in this study are all isogenic strains and have been specifically created for the purpose of the analysis. All mutations or insertions present in these strains come from either already existing and previously characterized strains, or correspond to deletion of genes, which deletion by other antibiotic markers are known to lead to the expected phenotypes. A precise list of strains (origin and construction) is provided in Table 1 in the main text. In addition, the classical phenotypes associated with deletion of the constitutive expression of the three different adhesins studied here (*i.e.* type 1 fimbriae, the Ag43 adhesin and the F pili) were systematically verified by different assays such as yeast agglutination and biofilm formation for type 1 fimbriae, western blot immunodetection and bacterial autoaggregation for the Ag43 adhesin, and M13 phage sensitivity and biofilm formation for the F pili (see Table S1 for details).

**Table S1.** Phenotypic assays to validate the constructed strains.

<b>Strains</b>	<b>Motility</b>	<b>Yeast Agglutination</b>	<b>Biofilm formation</b>	<b>Bacterial Autoaggregation</b>	<b>Ag43 immunodetection</b>	<b>M13 phage sensitivity</b>
<b>E2152</b>	-	-	+/-	-	-	-
<b>E2146</b>	-	+++	+++	-	-	-
<b>E2498</b>	-	-	++	+++	+++	-
<b>E2302</b>	-	-	+++	+/-	-	+++

For all mutant strains of interest in this study, the results of motility, yeast agglutination and biofilm formation tests are reported for type 1 fimbriae, western blot immunodetection and bacterial autoaggregation for Ag43 adhesin, and M13 phage sensitivity and biofilm formation for F pili.

Dans ce chapitre nous avons analysé les propriétés mécaniques (module d'Young et pression de turgescence), électrostatiques (densité de charge volumique) et hydrodynamique (perméabilité) de quatre souches bactériennes *E. coli* qui expriment (ou non) à la surface de leur membrane externe des structures de surface (*fimbriae* de type-1, *pili* de type-F et adhésine Ag43). Nos résultats ont montré qu'à faible force ionique (1mM), l'élasticité et la pression de turgescence diminuent lorsque des structures filamenteuses (*fimbriae* et *pili*) recouvrent la membrane externe. Au contraire, à 100 mM, elles restent quasi-constantes et sont systématiquement plus faibles qu'à faible force ionique quelle que soit la nature des structures externes de surface. Nos résultats montrent que la présence de ces structures autour de la bactérie agit comme une barrière de protection et atténue l'impact d'un changement de force ionique dans le milieu extracellulaire. Ceci peut être relié à l'établissement de gradients ioniques dans la structure molle, associée aux appendices de surface, avec pour résultat, un affaiblissement du stress osmotique ressenti par les bactéries et une diminution de la pression de turgescence. Finalement, nous avons montré que les variations de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique sont corrélées à la nature et à la présence/absence d'appendices autour de la membrane, en accord avec les géotypes et phénotypes des bactéries et l'imagerie AFM.

Dans de futurs travaux, cette analyse en régime statique des propriétés électrohydrodynamiques et mécaniques des quatre souches bactérienne sera étendue à une étude dans les régimes dynamiques hors-équilibre où les bactéries seront soumises à des stimulations électrique et mécaniques dépendantes en fréquence. Il est attendu que la connaissance des propriétés physico-chimiques des bactéries dans le régime statique et dynamique, autorisera une compréhension quantitative de leurs propriétés d'adhésion sur des substrats dont la chimie de surface est contrôlée.





## **Chapitre 7**

# **Etude Préliminaire des Premiers Stades d'Adhésion Bactérienne sous Conditions Hydrodynamiques Contrôlées**



Dans les milieux aqueux naturels, de nombreuses cellules bactériennes vivent essentiellement attachées à une surface de telle sorte que les bactéries sous leur forme libre « planctonique » sont minoritaires [1]. En effet, les bactéries ont une propension à coloniser des surfaces biotiques et abiotiques pour former des communautés organisées appelées biofilms\*. La formation de ces biofilms intervient sur de nombreux matériaux en contact avec un milieu aqueux comme les canalisations, les pipelines, les dents, les coques de bateaux, les cathéters ou encore les prothèses. Elle peut avoir des conséquences sévères dans de nombreux secteurs industriels (industrie de l'eau, agroalimentaire, pétrolière) et peut présenter un risque pour la santé publique. Un grand nombre de domaines est donc concerné par les biofilms et, de ce fait, par les mécanismes qui déterminent l'étape initiale de leur formation : l'adhésion plus ou moins réversible des bactéries sur les surfaces. Cette étape est contrôlée par un grand nombre de facteurs. Parmi eux, nous pouvons citer le conditionnement de la surface à coloniser (dépôt de molécules organiques et inorganiques sur la surface), le transfert massique des bactéries (mouvement brownien, motilité, sédimentation, transport convectif), la charge et la balance hydrophobe/hydrophile de la surface à coloniser et de la bactérie, la topographie de la surface (rugosité) et les propriétés physico-chimiques du milieu environnant (pH, force ionique, nature du sel, température, etc) [1].

L'adhésion bactérienne est donc contrôlée en partie par le couplage entre les interactions bactérie-surface et bactérie-bactérie (interactions électrostatiques, hydrophobes, de van der Waals, stériques, etc) et le transfert massique des bactéries par diffusion convective. Deux situations limites peuvent être dressées. Dans le cas où le flux convectif vers/parallèlement à la surface engendre une déposition plus rapide des bactéries sur la surface à coloniser, l'adhésion bactérienne est limitée par le transport massique. En revanche, si une augmentation du flux convectif conduit à une réduction de la déposition des bactéries ou favorise leur détachement de la surface, l'adhésion est limitée par les interactions entre les bactéries et la surface [3].

---

\* Communauté structurée de cellules microbiennes incluses dans une matrice de polymère autoproduite et adhérentes entre elles et/ou à des surfaces ou interfaces vivantes ou inertes [2. Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M., *Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology* **1995**, *49*, 711-745.]

Originellement l'objectif de cette étude était d'analyser les premiers stades d'adhésion des quatre souches bactériennes *Escherichia coli* K12 (*E. coli*) décrites précédemment (Chapitres 5 et 6) sur des surfaces de verre dans des conditions de transport (par diffusion/convection) contrôlées. Pour rappel, ces souches mutantes diffèrent selon la nature des structures externes qu'elles présentent (ou pas) sur leurs parois, c'est-à-dire les *fimbriae* de type-1, les *pili* de type-F, et les adhésines Ag43. Les mesures ont été effectuées dans une chambre à flux convectif tangentiel contrôlé que nous avons développée spécifiquement pour cette étude. Il s'agit ici d'étudier la cinétique d'adhésion de chaque bactérie, dont nous avons déjà déterminé les propriétés électrohydrodynamiques et mécaniques au Chapitre 6, dans des conditions variées de débit hydrodynamique et de corrélérer cette cinétique d'adhésion à la nature des structures de surfaces entourant les bactéries et à leurs propriétés physico-chimiques respectives. Pour un débit donné, la distribution des bactéries déposées sur la surface a été visualisée par microscopie à fluorescence<sup>†</sup> et ce pour différents temps d'adhésion. La localisation des bactéries sur la surface, leur organisation ont plus précisément été quantifiées *via* l'utilisation d'un programme de calcul MATLAB que nous avons développé et qui permet une évaluation fine de la quantité de bactéries adsorbées sous forme isolée ou agrégée (clusters), de la taille des agrégats et de la distance entre premiers voisins. Ici, nous présenterons les résultats préliminaires d'adhésion de *E. coli* sur une surface de verre. Nous avons choisi comme premier sujet d'étude la bactérie E2146 qui manifeste à sa surface des structures externes de type *fimbriae* connues pour leur rôle déterminant dans l'attachement initial cellule-surface [4]. Les données acquises nous ont permis de mettre au point (i) un montage expérimental, (ii) un protocole de mesure et (iii) un programme de traitement informatique.

### **7.1. Conception de la chambre d'écoulement, et développement du programme MATLAB pour le traitement des clichés d'adhésion.**

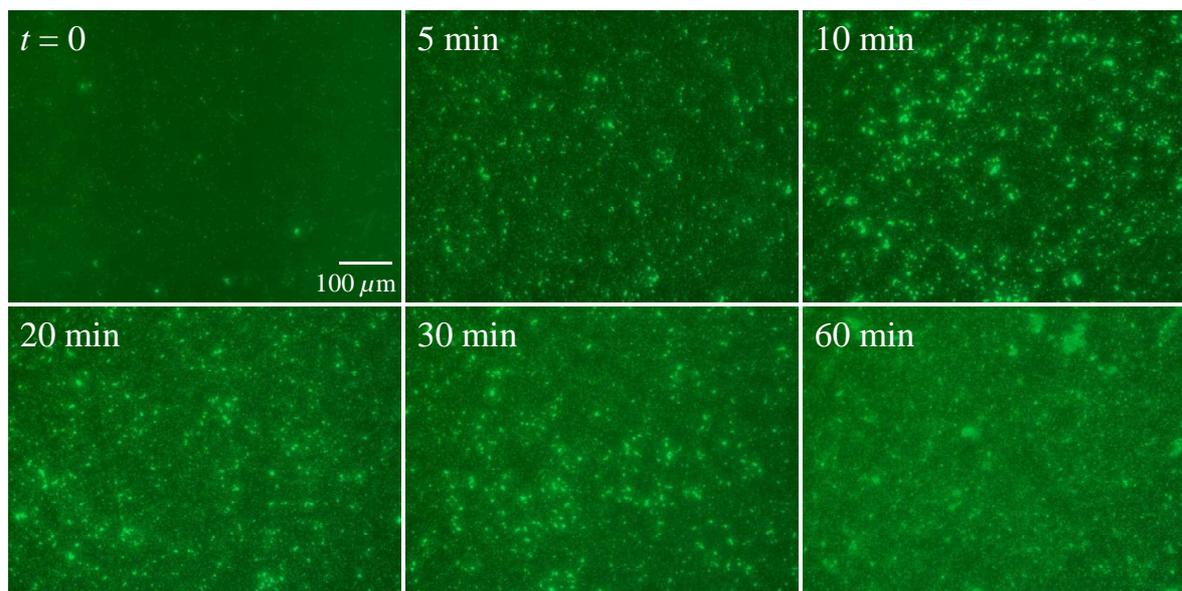
Avant de présenter les résultats de cinétique d'adhésion, intéressons-nous d'abord au montage expérimental et au traitement des données. En effet, ceux-ci ont été entièrement développés dans le cadre de cette étude.

---

<sup>†</sup> Les quatre souches ont été modifiées afin d'exprimer naturellement le marqueur GFP (Green Fluorescent Protein) qui manifeste une fluorescence verte lorsqu'il est excité par une lumière bleue ou ultraviolette.

Premièrement, nous avons construit spécialement pour nos expériences une chambre d'écoulement à flux tangentiel contrôlé, représentée dans la Figure 5.11 du Chapitre 5. Sa géométrie assure l'établissement d'un flux laminaire au niveau des surfaces de verre pour des nombres de Reynolds tels que  $Re \leq 1000$  (voir le Chapitre 5 §5.5 pour plus d'informations). Pour cette étude préliminaire dont les premiers résultats sont présentés dans ce chapitre, nous avons considéré des surfaces simples de verre. La taille des coupons d'adhésions insérés dans la chambre d'écoulement a été choisi en vue d'effectuer sur ces mêmes coupons (i) des expériences AFM visant à quantifier le détachement latéral des bactéries sous contraintes imposées par une pointe et (ii) des expériences électrocinétiques pour quantifier en fonction du temps d'adhésion la modification des propriétés électrostatiques de la surface colonisée. Ces contraintes ont résulté en une dimension des surfaces de verre de 10x20x1mm et, par ailleurs, ne permettent pas une observation *in situ* de l'adhésion des bactéries. L'observation des coupons a, dans notre étude, été réalisée par microscopie à fluorescence après démontage de la cellule.

Deuxièmement, nous avons optimisé les conditions expérimentales *i.e.* choix du milieu de suspension, de la concentration en bactéries dans le milieu, des débits hydrodynamiques et des temps d'adhésion. Ainsi, les bactéries sont suspendues dans le milieu pauvre M63B1 + 0,4% glucose à une  $DO_{600} = 1$ . Les surfaces de verre, insérées dans la chambre d'écoulement, sont mises en contact avec la suspension bactérienne dont l'écoulement tangentiel est contrôlé (débit hydrodynamique  $Q$  de 50, 100, 150, 200, 400 et 600 mL.h<sup>-1</sup>) et ce pendant des temps variés (5, 10, 20, 30, et 60 minutes). Les nombres de Péclet  $Pe$  associés aux débits hydrodynamiques choisis sont compris entre  $10^3$  et  $10^4$ , c'est-à-dire  $Pe \gg 1$  quel que soit le débit imposé. Les transports bactériens sont donc purement convectifs (voir le Chapitre 5 §5.5.1). Une fois le temps d'adhésion choisi atteint, les coupons de verre sont retirés de la chambre en s'assurant que les échantillons ne sèchent pas (réorganisation des dépôts bactériens sous l'effet des forces de capillarité). Ces échantillons sont ensuite observés par microscopie à fluorescence. La Figure 7.1 représente des clichés typiques de bactéries adhérees (apparaissant en vert) sur la surface de verre (de couleur plus sombre) pour différents temps d'adhésion et pour un débit hydrodynamique de 50 mL.h<sup>-1</sup>. Le temps initial  $t = 0$  marque la transition entre la pause hydrostatique et l'écoulement de la suspension au débit choisi (voir le Chapitre 5 §5.5.2).



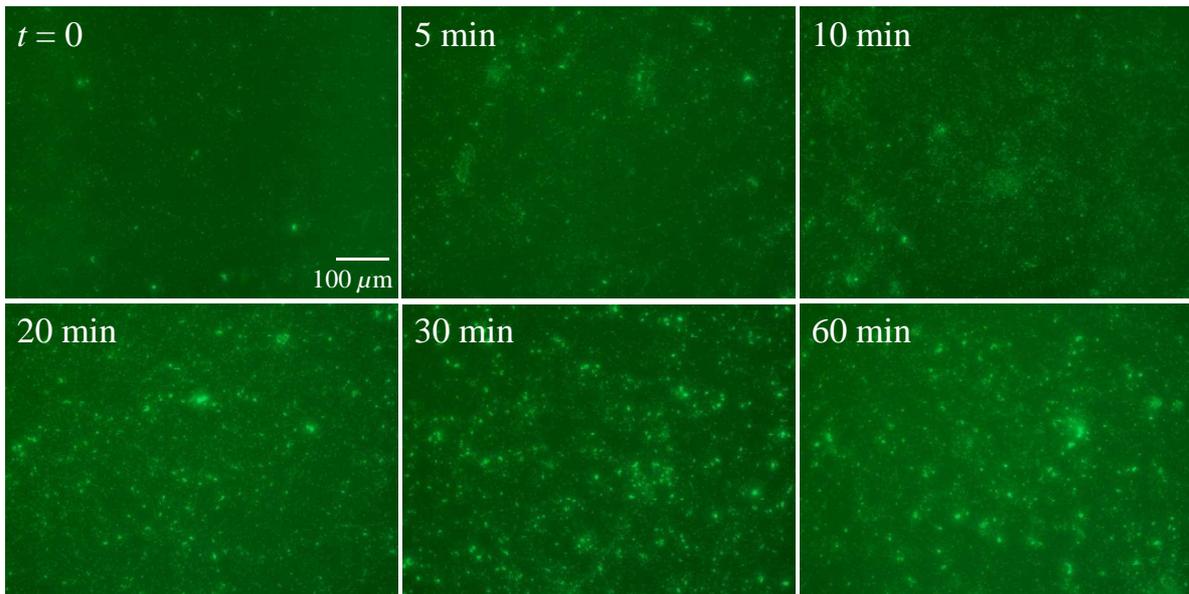
**Figure 7.1.** Images, par microscopie à fluorescence, de bactéries (en vert) adhérentes sur une surface de verre sous un débit hydrodynamique de  $50 \text{ mL.h}^{-1}$  et pour différents temps d'adhésion (indiqué).

Troisièmement, un programme de traitement des clichés sous le logiciel MATLAB (détails dans le Chapitre 5 §5.5.4) a été développé pour évaluer :

- le taux de recouvrement de la surface par les bactéries (*i.e.* le rapport entre la surface occupée par les bactéries et la surface totale)
- l'aire et le périmètre de chaque agrégat bactérien formé
- la distance entre premiers voisins bactériens sur la surface

## **7.2. Cinétique d'adhésion de bactéries E2146 sur des coupons de verre : résultats préliminaires.**

Comme précisé au-dessus, les expériences d'adhésion ont été d'abord menées sur la bactérie E2146 (surexpression de *fimbriae*) pour six temps d'adhésion et six débits d'écoulement différents. Dans la Figure 7.1, nous avons représenté des clichés obtenus pour les 6 temps d'adhésion sous un débit hydrodynamique fixé à  $50 \text{ mL.h}^{-1}$ . Pour comparaison, la Figure 7.2 montre les clichés obtenus pour les mêmes temps d'adhésion sous un débit hydrodynamique de  $400 \text{ mL.h}^{-1}$ .



**Figure 7.2.** Images, par microscopie à fluorescence, de bactéries (en vert) adhérees sur une surface de verre sous un débit hydrodynamique de  $400 \text{ mL.h}^{-1}$  et pour différents temps d'adhésion (indiqué).

Une comparaison rapide des images nous renseigne qualitativement sur la relation entre la cinétique d'adhésion des bactéries sur les surfaces et la magnitude du flux convectif tangentiel. Ici, une augmentation du débit hydrodynamique implique une diminution de la quantité de bactéries déposées sur la surface. Pour  $Q = 400 \text{ mL.h}^{-1}$ , les bactéries semblent significativement présentes sous la forme isolée et la quantité d'agrégats formés semblent diminuer comparativement à la situation où le débit est fixé à  $Q = 50 \text{ mL.h}^{-1}$ .

Les taux de recouvrement  $\theta$  calculés pour chaque débit en fonction du temps d'adhésion  $t$  sont représentés dans la Figure 7.3. Par souci de clarté, les incertitudes sur  $\theta$  ne sont pas montrées sur la figure (ces incertitudes correspondent à environ 10% de la valeur de  $\theta$ ). Chaque courbe manifeste une croissance exponentielle vers une valeur asymptotique maximale. Nous avons donc représenté sur la figure par des lignes pointillées les courbes de tendance associées. Ces courbes de tendance satisfont la relation empirique :

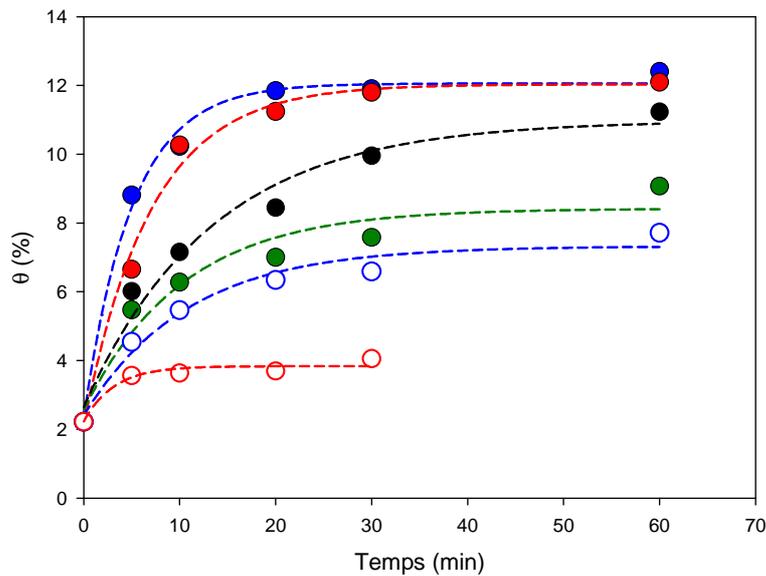
$$\theta(t) = \theta_0 + \theta_1(1 - \exp(-At)) \quad (7.1)$$

où  $\theta_0$  est le taux de recouvrement à  $t = 0$ . Cette origine de l'échelle temporelle est choisie juste après l'étape de pause hydrostatique (ce qui explique pourquoi  $\theta_0$  n'est pas nul),  $\theta_0 + \theta_1$  représente le taux maximal de recouvrement et  $1/A$  est la constante cinétique caractéristique d'adhésion de la bactérie. L'ensemble de ces paramètres est indiqué dans le Tableau 7.1.

$Q$ (mL.h <sup>-1</sup> )	50	100	150	200	400	600
$\theta_0$ (%)	2,28	2,10	2,64	2,54	2,39	2,22
$\theta_1$ (%)	9,76	9,92	8,33	5,86	4,93	1,61
$A$ (min <sup>-1</sup> )	0,20	0,14	0,075	0,097	0,093	0,318

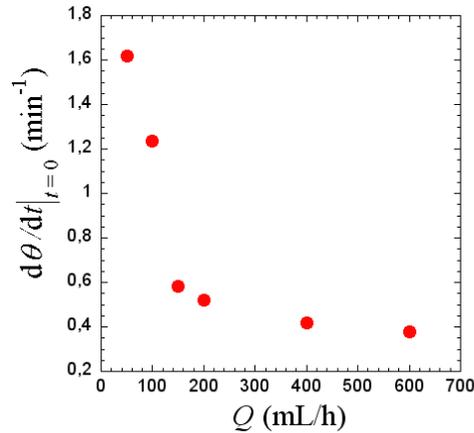
**Tableau 7.1.** Paramètres utilisées pour la modélisation des variations de  $\theta$  en fonction de  $t$  pour chaque débit hydrodynamique.

Pour chaque temps  $t$ , une diminution du débit  $Q$  entraîne une augmentation de  $\theta$ . Ceci implique que, dans ces conditions, le flux de transport bactérien convectif inhibe la déposition des bactéries sur la surface et/ou contribue fortement au détachement des bactéries déjà adhérees. L'adhésion bactérienne est donc, dans les conditions examinées, limitée par les interactions bactéries-surfaces. Pour un temps  $t$  donné, on remarque qu'une diminution de  $Q$  de 100 à 50 mL.h<sup>-1</sup>, n'a pas ou peu d'influence sur la quantité maximale de bactéries adhérees.



**Figure 7.3.** Variations du taux de recouvrement  $\theta$  en fonction du temps d'adhésion  $t$  pour différents débits hydrodynamiques  $Q$  avec  $Q = 50$  mL/h (cercles pleins bleus),  $Q = 100$  mL/h (cercles pleins rouges),  $Q = 150$  mL/h (cercles noirs),  $Q = 200$  mL/h (cercles verts),  $Q = 400$  mL/h (cercles vides bleus) et  $Q = 600$  mL/h (cercles vides rouges). Les lignes pointillées représentent les courbes de tendance pour chaque débit.

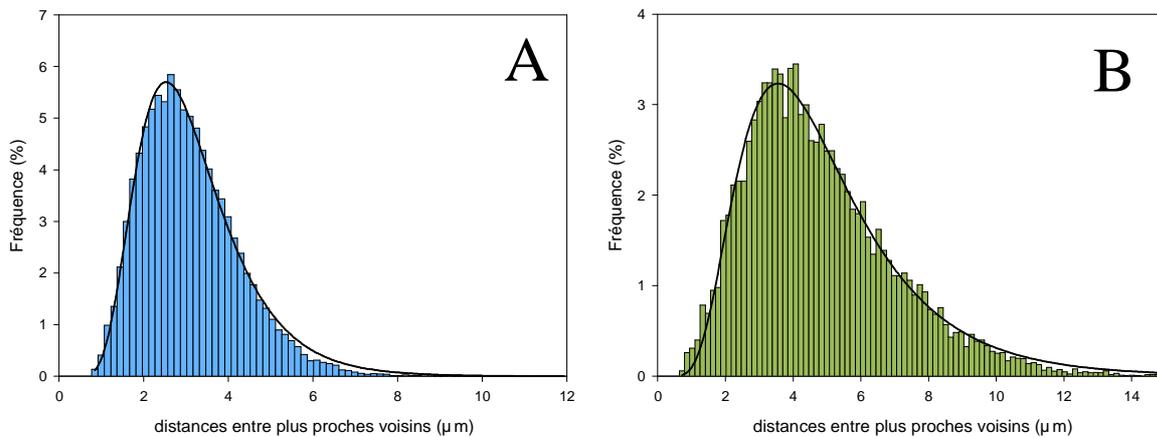
Cependant, le taux initial de déposition défini par  $d\theta/dt|_{t=0}$  augmente. Ce résultat est confirmé dans la Figure 7.4 où nous avons représenté les variations de  $d\theta/dt|_{t=0}$  en fonction de  $Q$ .



**Figure 7.4.** Variations du taux de déposition initial en fonction du débit d'écoulement  $Q$ .

Dans la situation où l'adhésion bactérienne est limitée par le transfert massique des bactéries vers/depuis la surface à coloniser, le taux initial de déposition augmente sous l'effet de l'augmentation de  $Q$  selon une loi puissance [3]. Dans notre cas, le taux initial de déposition diminue lorsque  $Q$  augmente et ce sur toute la gamme de débits considérés. Ce résultat prouve encore une fois que, dans nos conditions, l'adhésion bactérienne est limitée par les interactions bactérie-surface.

Pour finir, intéressons-nous brièvement à l'influence du débit d'écoulement  $Q$  sur la distance entre premiers voisins. A titre d'exemple, nous avons représenté dans les Figures 7.5A et 7.5B les résultats obtenus à  $t = 5$  minutes pour des débits  $Q = 50 \text{ mL.h}^{-1}$  et  $Q = 400 \text{ mL.h}^{-1}$ , respectivement, sous la forme d'histogrammes.



**Figure 7.5.** Histogrammes des distances entre premiers voisins à  $t = 5$  min pour (A)  $Q = 50 \text{ mL/h}$  et (B)  $Q = 400 \text{ mL/h}$ . Les lignes pleines correspondes aux courbes de tendance de type log-normal.

Les distributions des distances entre premiers voisins  $x$  suivent parfaitement une distribution de type log-normal  $f(x)$  avec

$$f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2}(\log(x) - \mu)^2\right) \quad (7.2)$$

où  $\mu$  est la moyenne du logarithme des distances  $x$  et  $\sigma$  est l'écart type. Ces deux paramètres sont données par  $\mu = 1,06 \mu\text{m}$  et  $\sigma = 0,37 \mu\text{m}^{1/2}$  pour  $Q = 50 \text{ mL.h}^{-1}$ , et  $\mu = 1,46 \mu\text{m}$  et  $\sigma = 0,47 \mu\text{m}^{1/2}$  pour  $Q = 400 \text{ mL.h}^{-1}$ . La distance moyenne entre premiers voisins  $m$  et la variance  $v$  sont déterminées à partir de  $\mu$  et  $\sigma$  avec :

$$m = \exp(\mu + \sigma^2 / 2) \quad (7.3)$$

et 
$$v = \exp(2\mu + \sigma^2)(\exp(\sigma^2) - 1). \quad (7.4)$$

On obtient alors  $m = 3,08 \mu\text{m}$  et  $v = 1,44 \mu\text{m}^2$  pour  $Q = 50 \text{ mL.h}^{-1}$ , et  $m = 4,81 \mu\text{m}$  et  $v = 5,84 \mu\text{m}^2$  pour  $Q = 400 \text{ mL.h}^{-1}$ .

Dans le cas d'une distribution complètement aléatoire des bactéries sur la surface, la moyenne des distances entre premiers voisins est donnée par [5]:

$$m_{\text{random}} = \frac{0,5}{\sqrt{\frac{\theta}{100 * s_{E2146}}}} \quad (7.5)$$

où  $s_{E2146}$  est la surface de la bactérie E2146. Dans un milieu de force ionique égale à 1 mM,  $s_{E2146} = 2,8\mu\text{m}^2$  (voir Table 3 dans le Chapitre 6). On obtient pour  $Q = 50 \text{ mL.h}^{-1}$ ,  $m_{\text{random}} = 2,8 \mu\text{m}$  et pour  $Q = 400 \text{ mL.h}^{-1}$ ,  $m_{\text{random}} = 3,9 \mu\text{m}$ . En comparant ces résultats avec les valeurs de  $m$  obtenues expérimentalement, on obtient, quel que soit  $Q$ ,  $m < m_{\text{random}}$ . Ce résultat indique que les bactéries ont tendance à former sur la surface des clusters, c'est-à-dire des petits agrégats bactériens. Nous pouvons observer cette tendance grâce aux images de microscopie à fluorescence présentées dans les Figures 7.1 et 7.2.

Maintenant, comparons les valeurs de  $m$  en fonction de  $Q$ . Lorsque  $Q$  augmente de 50 à 400  $\text{mL.h}^{-1}$ , les bactéries isolées et les agrégats bactériens déposés sur la surface sont mieux séparés les uns des autres (la distance moyenne entre premiers voisins  $m$  augmente de 3,08  $\mu\text{m}$  à 4,81  $\mu\text{m}$ ). C'est ce que l'on observe qualitativement à travers les images des Figures 7.1 et 7.2. De plus, ce résultat est en accord avec la chute de l'espace occupé par les bactéries sur la surface lorsque  $Q$  augmente ( $\theta$  diminue de 8,8 à 4,6%).

La dernière étape de ce travail exploratoire est la détermination de la force d'attachement des bactéries sur la surface de verre par AFM. Le détachement des bactéries est réalisé en appliquant une force latérale croissante entre une pointe AFM et les bactéries jusqu'à ce que la force appliquée domine la force d'interaction bactérie-surface et décroche la bactérie adhérente. Pour se faire, une image AFM de la surface analysée est d'abord réalisée. Dans notre cas, même en appliquant une force minimale entre la pointe et l'échantillon (500pN), les bactéries se décrochent de la surface. Les bactéries sont donc très faiblement adhérentes à la surface ce qui a rendu impossible une détermination quantitative précise de leur force d'attachement.

### 7.3. Conclusions et Perspectives.

Dans ce chapitre, nous avons présenté des expériences exploratoires pour l'étude de la cinétique d'adhésion de bactéries *E. coli* sur des plaques de verre dans des conditions hydrodynamiques contrôlées. Ces expériences réalisées sur la bactérie E2146 (surexpression de *fimbriae*) nous ont permis de développer et d'optimiser un dispositif de mesure et un programme de traitement des données.

Nos résultats ont montré que le taux de recouvrement de la surface par les bactéries et le taux initial de déposition augmentent lorsque le débit d'écoulement, et donc le flux de transport des bactéries par convection, diminuent. Ceci indique que l'adhésion de la bactérie E2146 sur des surfaces de verre est principalement limitée par les forces d'interaction bactérie-surface (de nature électrostatique, hydrophobe et de van der Waals). Ce résultat est en accord avec les expériences AFM qui ont montré que la magnitude de la force d'interaction entre la bactérie et la surface de verre est inférieure à 500 pN. Suite à cette étude préliminaire des expériences sont en cours sur l'adhésion de ces mêmes bactéries sur des surfaces de verre recouvertes d'une monocouche de polyéthylèneimine (PEI), polyélectrolyte chargé positivement et ce manière à favoriser la fixation des bactéries une fois déposées. Il est attendu qu'à la fois le taux de recouvrement, le taux initial de déposition et la force d'attachement bactérie-PEI augmentent sous l'effet des forces électrostatiques attractives entre les bactéries et le PEI comparativement aux résultats présentés dans ce chapitre.

De plus, nous pourrions déterminer si les propriétés physico-chimiques des bactéries sont (ou ne sont pas) à l'équilibre durant la fixation des bactéries vers/depuis la surface à coloniser. Pour se faire nous estimerons le taux (ou le temps) caractéristique d'adhésion des bactéries, à

un débit donné, et nous le comparerons aux temps caractéristiques associés à la relaxation des interphases bactériennes qui seront déterminés par Spectroscopie de Relaxation Diélectrique dans le cadre d'une thèse débutée depuis octobre 2011 au laboratoire (Jennifer Martin – *dynamique de spéciation de cations métalliques aux interphases molles biotiques (bactéries) et abiotiques (hydrogels)*).

### **Références Bibliographiques.**

1. Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J., Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2007**, *34* (9), 577-588.
2. Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M., Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **1995**, *49*, 711-745.
3. Kalasin, S.; Santore, M. M., Hydrodynamic crossover in dynamic microparticle adhesion on surfaces of controlled nanoscale heterogeneity. *Langmuir* **2008**, *24* (9), 4435-4438.
4. Van Houdt, R.; Michiels, C. W., Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Research in Microbiology* **2005**, *156* (5–6), 626-633.
5. Russ, J. C., *The image precessing handbook: Fifth edition*. Taylor & Francis: Boca Raton, London, New York, 2006; Vol. p. 556.





## Conclusion Générale

Dans les milieux naturels, la matière solide est essentiellement présente sous la forme de (bio)particules dites molles (*e.g.* bactéries, particules virales, acides humiques, etc). La présence de structures souples de type polyélectrolyte dans le volume de la (bio)particule molle ou à sa surface lui confère une perméabilité hydrodynamique aux ions et aux flux hydriques qui la différencie des particules dures, rigides, non perméables aux ions et au solvant. Ces (bio)particules molles sont sans cesse soumises à des contraintes électriques, hydrodynamiques et/ou mécaniques issues des interactions qu'elles entretiennent avec des ions ou des particules présentes dans leur voisinage. Sous l'effet de ces perturbations, les (bio)interphases molles, qu'elles développent avec leur milieu environnant, et leurs propriétés physico-chimiques évoluent continuellement dans le temps selon des processus dits de relaxation. Ces (bio)interphases ne maintiennent donc pas nécessairement une configuration complètement relaxée (*i.e.* d'équilibre) pendant les processus interfaciaux *e.g.* d'interactions électrostatiques interparticulaires ou encore de complexation avec des métaux présents dans le milieu.

Dans ce contexte, les travaux de recherche théoriques et expérimentaux menés pendant cette thèse ont porté sur l'évaluation:

- des propriétés électro-hydrodynamiques et/ou mécaniques de (bio)interphases molles hétérogènes complètement relaxées et/ou non relaxées (*i.e.* dans le régime transitoire hors-équilibre qui suit la perturbation)
- de l'énergie d'interaction électrostatique entre (bio)particules molles hétérogènes et multicouches dans le régime d'équilibre
- de l'impact de la dynamique hors-équilibre des propriétés électriques de (bio)films polymériques mous ligands sur leur capacité à former des complexes avec des cations métalliques.

Nous avons dans un premier temps évalué à l'aide d'un formalisme théorique les énergies d'interactions électrostatiques entre (bio)particules molles multicouches hétérogènes en régime d'équilibre (Chapitre 2). Le modèle est suffisamment complet pour intégrer les effets de courbure des (bio)particules molles (au-delà du traitement de Derjaguin) et considérer les

interactions entre (bio)particules portant une densité de charge de forte magnitude (au-delà des approximations de Debye-Hückel). Cette approche est a priori l'étude la plus complète et pertinente disponible dans la littérature pour estimer les interactions électrostatiques entre (bio)particules de relevance environnementale. En effet, elle intègre toutes les situations en terme de taille de particules, magnitude des densités de charge, dissociation des groupes ionogéniques, degré d'hétérogénéité dans la distribution spatiale de ces groupements et ce pour chaque couche composant la structure molle de la particule. Nous avons notamment montré que les propriétés électrostatiques des couches internes entourant la particule pouvaient contrôler à la fois le signe et la magnitude de l'énergie d'interaction électrostatique, en particulier à faible force ionique. De plus, nous avons souligné l'incapacité des précédentes théories basées sur les traitements de Derjaguin et de Debye-Hückel à reproduire nos résultats numériques pour des petites particules (de rayon inférieur à quelques dizaines de nanomètres) dans un milieu de faible force ionique. Ces résultats témoignent des limites des expressions analytiques développées par Ohshima (particules molles monocouches homogènes en accord avec un traitement de Derjaguin et/ou de Debye-Hückel) pour interpréter la contribution de chaque couche perméable enveloppant les particules en interaction dans le contrôle de leur énergie d'interaction électrostatique.

Afin de mieux comprendre les processus régulant la réactivité des interphases molles dans les écosystèmes aquatiques, il est nécessaire d'élaborer des formalismes théoriques en y incluant une dimension temporelle. Nous avons donc développé deux modèles théoriques et deux expériences associées pour une meilleure compréhension de la dynamique des (bio)interphases molles et de leur réactivité chimique depuis le régime transitoire jusqu'au régime stationnaire et d'équilibre.

Premièrement, nous avons dérivé un modèle consacré à la dynamique de spéciation de cations métalliques dans un film polymérique mou dans lequel sont distribués des sites réactifs susceptibles de complexer ces cations (Chapitre 3). Pour la première fois, cette étude a permis d'évaluer l'impact de la dynamique spatio-temporelle d'établissement de la double couche électrique sur les processus chémodynamiques définis par le couplage entre le transport des métaux depuis/vers le film réactif *et* la cinétique de complexation locale au sein du film. La méthode consiste à stimuler électriquement le film ligand, initialement à l'équilibre, en appliquant un champ électrique fréquentiel. Les variations de la permittivité

diélectrique du système sont déterminées en fonction de la fréquence du champ appliqué, laquelle fréquence peut être perçue comme une sonde temporelle permettant de disséquer les différents processus de complexation/transport pertinents selon leur échelle de temps caractéristiques. Le couplage complexe entre les processus électrodynamiques et chémodynamiques est contrôlé par des fréquences caractéristiques de formation/dissociation du complexe et de relaxation de double couche électrique. Ainsi, nous avons montré que ces fréquences de formation/dissociation du complexe impactaient à la fois la magnitude et la forme des spectres diélectriques obtenus. Suivant la fréquence du champ appliqué, la nature inerte/dynamique et la labilité du complexe ont été déterminées pour une combinaison quelconque des trois fréquences caractéristiques citées. Nos résultats ont conduit à une collaboration entre le LEM et le *Max Bergmann Center of Biomaterials* (Dresde, Allemagne). Dans le cadre de cette collaboration, une cellule de mesure diélectrique a été développée pour l'étude du couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques dans des films polyélectrolytes minces mous ligands dont les propriétés physico-chimiques (épaisseur, densité de charge) à l'équilibre sont déjà connues par des analyses expérimentales et théoriques de courant/potentiel d'écoulement effectuées par les deux groupes de recherche cités précédemment.

Deuxièmement, le dernier modèle théorique élaboré dans cette thèse (Chapitre 4) a pour objectif l'analyse de la dynamique de (bio)interphases molles dans les régimes d'équilibre thermodynamique et hors-équilibre. Cette approche est à ce jour l'étude la plus générale car les (bio)particules molles considérées sont enveloppées d'une succession de couches molles de caractéristiques différentes (épaisseur, densité de charge, hétérogénéités spatiales). De plus, elle intègre les situations de suspensions concentrées et diluées de particules de type cœur/couronne mais également de particules dures ou entièrement polyélectrolytes. Cette approche est donc une amélioration du modèle de Ahualli *et al.* strictement valide dans le cas de suspensions de particules molles monocouches homogènes. Pour évaluer les propriétés électrodynamiques des (bio)interphases, la suspension particulière est perturbée électriquement par un champ de fréquence variable. Les variations de la permittivité diélectrique et de mobilité dynamique en fonction de cette fréquence sont examinées. La relaxation vers un état d'équilibre de la double couche électrique (localisée à la surface et au sein de la (bio)particule molle) perturbée électriquement est régulée par deux processus de relaxation : la relaxation MWO (migration des ions dans la double couche électrique) et la

relaxation  $\alpha$  (établissement d'un gradient de concentration d'électrolyte neutre autour de la particule). A travers l'examen de l'évolution temporelle de ces processus et de leur impact respectif sur les spectres de permittivité et de mobilité, nous avons pu déterminer la contribution des propriétés physico-chimiques des couches molles internes enveloppant les particules dans le contrôle des variations de la mobilité/permittivité des suspensions particulières. Ainsi, les limites de la théorie de Ahualli *et al.* ont pu être mises en évidence. En effet, (i) négliger le gonflement/rétraction de l'interphase (sous un changement de force ionique ou de pH du milieu), (ii) négliger les propriétés électrostatiques, hydrodynamiques et structurales des couches internes et (iii) assimiler l'interphase multicouche à une interphase monocouche de même charge totale peut engendrer une forte sur/sous-estimation à la fois de la permittivité et de la mobilité (avec un possible changement de signe) sur toute la gamme des fréquences sondées. Parallèlement à cette étude, un montage expérimental de Spectroscopie de Relaxation Diélectrique (DRS), qui permettra d'évaluer expérimentalement la dynamique hors-équilibre de (bio)interphases, a été développé (plus de détails sur les applications de cette technique dans la partie Perspectives).

Ce dernier modèle servira de guide pour la compréhension des propriétés électrodynamiques d'interphases bactérienne dans le cadre de l'ANR Jeune Chercheur PHYSCHEMBACT. Son objectif est d'évaluer les contributions physico-chimiques gouvernant les interactions de bactéries avec leur environnement proche en conditions d'équilibre et/ou en conditions dynamiques en alliant l'acquisition de données expérimentales avec le développement de formalismes théoriques.

Dans le cadre de l'ANR, la dernière étude que nous avons menée est une analyse à l'équilibre des propriétés mécaniques (module d'Young et pression de turgescence), électrostatiques (densité de charge volumique) et hydrodynamiques (perméabilité) de quatre souches bactériennes mutantes *Escherichia Coli* soumises à un stress osmotique (Chapitre 6). Ces souches mutantes expriment spécifiquement (ou non) à la surface de leur membrane externe des structures de surface (*fimbriae* de type-1, *pili* de type-F et adhésine Ag43). Cette étude combine la Microscopie à Force Atomique (AFM-imagerie et spectroscopie de force) avec une technique électrocinétique : la microélectrophorèse. Les résultats obtenus ont montré le rôle clé joué par les propriétés mécaniques et électrostatiques dans le contrôle de la rétraction de l'interphase bactérienne sous l'effet d'une diminution de la force ionique du

milieu. En effet, les bactéries répondent à une diminution de force ionique de leur milieu environnant en régulant leur pression de turgescence à travers la libération d'eau depuis leur cytoplasme vers le milieu externe. Nos résultats ont montré qu'à faible force ionique (1mM), l'élasticité et la pression de turgescence diminuent lorsque des structures filamenteuses (*fimbriae* et *pili*) recouvrent la membrane externe. Au contraire, à 100 mM, elles restent quasi-constantes et sont systématiquement plus faibles qu'à faible force ionique quelle que soit la nature des appendices de surface. Nos résultats montrent que la présence de ces structures autour de la bactérie agit comme une barrière de protection et atténue l'impact d'un changement de force ionique dans le milieu extracellulaire. Ceci peut être relié à l'établissement de gradients ioniques dans la structure molle, associée aux structures de surface, avec pour résultat, un affaiblissement du stress osmotique ressenti par les bactéries et une diminution de la pression de turgescence. Finalement, nous avons montré que les variations de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique sont corrélées à la nature et à la présence/absence de structures autour de la membrane, en accord avec les génotypes et phénotypes des bactéries et l'imagerie AFM.

Les recherches menées durant cette thèse ont souligné la nécessité de prendre en compte pour l'analyse expérimentale et théorique des propriétés physico-chimiques de (bio)particules naturelles et de leur réactivité dans le milieu environnant :

- (i) une représentation des (bio)particules qui intègre la mollesse mécanique et hydrodynamique des particules, une hétérogénéité spatiale de la structure molle et la présence possible de plusieurs couches molles de propriétés différentes autour de la particule.
- (ii) l'impact de la dynamique spatio-temporelle d'établissement de la double couche électrique sur les processus gouvernant la réactivité des particules molles dans le milieu.

## Perspectives

Cette thèse constitue une première étape dans la description des processus régulant les interactions interparticulaires et la réactivité chimique de (bio)interphases à la fois en régime d'équilibre *et* en régime transitoire. Plusieurs applications/extensions des outils théoriques et expérimentaux développés durant cette thèse sont déjà en cours ou le seront ultérieurement.

Tout d'abord, dans le cadre de l'ANR PHYSCHEMBACT, des expériences de DRS seront menées sur les quatre mutants *E. Coli* dont les propriétés physico-chimiques à l'équilibre ont déjà été déterminées (voir le Chapitre 6). Ce travail sera effectué dans le cadre d'une thèse qui vient de débiter au laboratoire (Jennifer Martin – *dynamique de spéciation de cations métalliques aux interphases molles biotiques (bactéries) et abiotiques (hydrogels)*). Les résultats seront interprétés à l'aide du formalisme établi dans le Chapitre 4. Cette collection de données obtenues dans des conditions statiques et dynamiques permettront de comprendre l'adhésion de ces mêmes bactéries sur une surface sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Les expériences exploratoires d'adhésion bactérienne que nous avons réalisées ont permis la mise en place d'un dispositif et d'un protocole expérimental adapté pour cette étude (Chapitre 7). La cinétique d'adhésion et l'organisation des bactéries sur la surface seront déterminées pour chaque souche bactérienne et pour chaque débit hydrodynamique. Pour une souche bactérienne donnée et pour un débit donné, nous pourrions déterminer si les propriétés physico-chimiques des bactéries sont (ou ne sont pas) à l'équilibre durant le transport *et/ou* la fixation des bactéries vers/depuis la surface à coloniser en comparant les temps caractéristiques d'adhésion avec les temps caractéristiques associés à la relaxation des interphases bactériennes.

Nous avons indiqué qu'une cellule de mesure diélectrique a été construite en collaboration avec *Max Bergmann Center of Biomaterials* (Dresde, Allemagne) pour l'analyse de l'impact de la dynamique d'établissement de la double couche électrique sur les processus dynamiques de spéciation de cations métalliques dans des films polyélectrolytes minces mous et complexants. Les résultats expérimentaux seront analysés à l'aide de notre modèle (Chapitre 3).

Alors que cette cellule de mesure diélectrique permet l'investigation du couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques dans des films mous ligands, la cellule de DRS construite au laboratoire permettra l'analyse de ce couplage dans des suspensions de particules molles susceptibles de fixer des cations métalliques. Il serait donc intéressant d'effectuer des mesures de spectroscopie diélectrique sur des suspensions de particules, comme des particules microgels ou des acides humiques connues pour former des complexes avec des cations métalliques présents dans le milieu de suspension. Pour comprendre correctement les données acquises, celles-ci seront modélisées à l'aide d'un formalisme théorique en cours d'élaboration. La stratégie employée pour la dynamique de spéciation dans des films mous ligands sera adaptée au cas plus complexe des suspensions de particules molles. Ce nouveau formalisme devra tenir compte du transfert massique plus complexe des cations métalliques par diffusion, migration mais également par convection sous l'effet du flux électroosmotique généré par le déplacement de la particule par rapport à la phase liquide.

Bien sûr, cette liste d'applications n'est pas exhaustive. Par exemple, les propriétés électrodynamiques de suspensions de particules virales (*e.g.* bactériophages MS2 dépourvue ou non de leur ARN interne), dont les propriétés en régime d'équilibre ont déjà été déterminées par électrophorèse, pourront être analysées en couplant des mesures diélectriques par DRS avec les prédictions du modèle théorique présenté dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

Pour finir, considérons les modèles théoriques pour l'étude de la dynamique de (bio)interphases particulières (Chapitre 4) et pour l'étude du couplage entre processus électrodynamiques et chémodynamiques dans des films mous ligands (Chapitre 3). Ces deux modèles ont été développés dans la situation où les chaînes polymériques qui composent la structure molle des particules ou des films minces sont rigides. Le mouvement des chaînes chargées et la déformation de la structure molle suite à la perturbation électrique sont négligés. Il sera donc intéressant d'examiner la dynamique des chaînes polymériques, à laquelle est associée un temps caractéristique de relaxation, et d'évaluer son impact sur la dynamique des (bio)interphases et sur la dynamique de spéciation de métaux.



**AUTORISATION DE SOUTENANCE  
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Bruno LARTIGES, Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse,  
Monsieur Paulo PINHEIRO, Professeur, CMQE/IBB, Universidade do Algarve,  
Campus de Gambelas - FARO (Portugal)**

L'Administrateur Provisoire de l'Université de Lorraine, autorise :

**Mademoiselle MERLIN Jenny**

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Propriétés électrostatiques, mécaniques et chémodynamiques de (bio)interphases molles : analyses en régime d'équilibre et transitoire"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

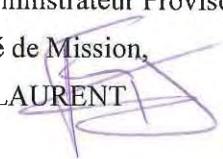
Intitulé du doctorat : **"Géosciences"**

Fait à Vandoeuvre, le **16 Mai 2012**

Pour l'Administrateur Provisoire par délégation,

Le Chargé de Mission,

François LAURENT







## **Propriétés électrostatiques, mécaniques et chémodynamiques de (bio)interphases molles : Analyses en régime d'équilibre et transitoire.**

### **Résumé**

Dans les milieux naturels, la matière solide est essentiellement présente sous la forme de (bio)particules molles perméables aux ions et aux flux hydriques. Ces particules sont sans cesse soumises à des perturbations électriques/mécaniques, de telle sorte que les propriétés physico-chimiques des (bio)interphases qu'elles forment avec le milieu évoluent continuellement dans le temps. Les (bio)interphases ne sont donc pas nécessairement à l'équilibre durant les processus interfaciaux (interactions électrostatiques, complexation de métaux). Dans ce contexte, nous avons évalué théoriquement l'énergie d'interaction électrostatique à l'équilibre entre (bio)particules molles multicouches de tailles et de densités de charge arbitraires. Puis nous avons déterminé l'impact de la dynamique hors-équilibre des propriétés électriques de (bio)films mous ligands sur leur capacité à former des complexes avec des métaux. Le dernier modèle théorique élaboré a pour objectif l'analyse de la dynamique de (bio)interphases multicouches hétérogènes en régimes d'équilibre *et* hors-équilibre. Enfin nous avons analysé à l'équilibre, en alliant l'AFM et l'électrophorèse, les propriétés mécaniques et électriques de bactéries *E. coli* exprimant spécifiquement (ou non) des structures de surface différentes. Toutes ces études ont montré la nécessité de prendre en compte pour l'analyse de la réactivité de (bio)particules dans leur milieu environnant (i) une représentation fidèle des (bio)particules (mollesse mécanique et hydrodynamique, hétérogénéité spatiale de la structure molle) et (ii) l'impact de la dynamique spatio-temporelle des (bio)interphases sur les processus gouvernant leur réactivité.

**Mots clés :** particules molles – interaction électrostatique – complexation métallique - *Escherichia coli* – Microscopie à Force Atomique – régime hors-équilibre – électrodynamique

## **Electrostatic, mechanical and chemodynamic properties of soft (bio)interphases: Analyses in equilibrium and transitory regimes.**

### **Abstract**

In natural media, the solid matter is mainly present as soft (bio)particles (bacteria, viruses, humic acids) which are permeable toward ions and hydric fluxes. These (bio)particles are unceasingly exposed to electrical/mechanical perturbations, so that the physicochemical properties of (bio)interphases, developed by (bio)particles with the medium, evolve continuously. (Bio)interphases are thus not necessarily at equilibrium during interfacial processes *e.g.* electrostatic interactions, complexation with metallic contaminants. Under such a context, we evaluated theoretically at equilibrium the electrostatic interaction energy between soft multilayered (bio)particles with arbitrary sizes and charge densities. We then determined the impact of non-equilibrium electric properties of soft ligand polymeric (bio)films on their ability to form complexes with metals. The aim of the last theoretical model developed here is to analyze the dynamics of multilayered heterogeneous (bio)interphases in both equilibrium *and* non-equilibrium regimes. Finally we analyzed at equilibrium, by coupling AFM and microelectrophoresis measurements, mechanical and electrical properties of bacterial strains *Escherichia coli* that specifically express (or not) different surface structures (*pili*, *fimbriae*, adhesin Ag43). All these studies highlighted the necessity to integrate for the analysis of (bio)particles reactivity with their surrounding medium (i) a close representation of soft (bio)particles (mechanical and hydrodynamic softness, spatial heterogeneity of the soft material) and (ii) the impact of spatiotemporal dynamics of (bio)interphases on the processes governing their reactivity.

**Key words :** soft particles – electrostatic interaction – metallic complexation - *Escherichia coli* – Atomic Force Microscopy – non-equilibrium regime – electrodynamics