Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Physique et Chimie des matériaux

Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris / Equipe Matériaux et Biologie

Conception de matrices magnétiques nanostructurées pour l'étude des mécanismes de biominéralisation intracellulaire

Par Marine Blondeau

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des matériaux

Dirigée par Thibaud Coradin, François Guyot et Roberta Brayner

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Faivre Damien	Chercheur habilité (Max Planck Institute, Potsdam)	Rapporteur
Viau Guillaume	Professeur (LPCNO, Toulouse)	Rapporteur
Valet Jean-Pierre	Directeur de recherche (IPGP, Paris)	Examinateur
Ménager Christine	Professeur (PECSA, Paris VI)	Examinatrice
Coradin Thibaud	Directeur de recherche (LCMCP, Paris VI)	Directeur de thèse
Guyot François	Professeur (MNHN, Paris)	Co-encadrant
Brayner Roberta	Maître de conférence (ITODYS, Paris VII)	Co-encadrante (Invitée)

A ma famille

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Clément Sanchez, ancien directeur du LCMCP pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au sein duquel j'ai pu passer 3 années enrichissantes et merci également à Florence Babonneau, la directrice actuelle. Merci au C'Nano Ile-de-France qui a financé ce projet de thèse.

J'aimerais dire un grand merci à Thibaud Coradin qui m'a donné toute sa confiance dans mes travaux de recherche, pour son encadrement exceptionnel et pour m'avoir encouragée. Un grand merci aussi à mes deux autres encadrants François Guyot et Roberta Brayner qui m'ont également beaucoup apporté. Je remercie François pour ses bons conseils et son aide précieuse tout au cours de cette thèse et merci à Roberta pour ses encouragements et sa grande sympathie.

Merci à Damien Faivre et Guillaume Viau, mes deux rapporteurs, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et merci également à Jean-Pierre Valet et Christine Ménager, mes deux examinateurs.
Je souhaite remercier du fond du cœur Corinne Chanéac qui a tout de suite pensé à moi pour faire ce sujet de thèse.

Je ne remercierai jamais assez Yohan Guyodo pour sa gentillesse et l'aide qu'il m'a grandement apportée pour effectuer les mesures magnétiques au sein de l'Institut de Physique du Globe de Paris. Merci également à France Lagroix.

Bien sûr je n'oublie pas l'équipe Nanobactérie (start-up). Tout d'abord Edouard Alphandéry pour son accueil au sein du labo à Cochin et pour son aide, puis Imène Chebbi et Mickael Durand-Dubief qui m'ont beaucoup apporté à la fois sur le plan humain et sur le plan scientifique.

Au cours de ces trois années, j'ai pu passer d'agréables moments au bâtiment F (Jussieu) au sein de l'équipe Matériaux et Biologie dans mon labo d'accueil où règne chaque jour la bonne humeur. J'aimerais remercier toute l'équipe dont Gervaise Mosser pour sa grande gentillesse et son aide en microscopie, Christophe Hélary pour son humour, Christophe Depagne qui m'a montré beaucoup de techniques à mon arrivée, Carole Aimé pour sa grande sympathie, Nadine Nassif pour ses bons conseils lorsque j'ai commencé ma thèse. J'aimerais remercier également Anny Anglo, Bernard Haye, Corinne Illoul sans qui il m'aurait été difficile d' observer mes échantillons en microscopie.
Merci à François, Aurélien, Nada, Cecilia, Marc, Laura, Hugo, Elodie, Agathe et Sylvain avec qui j'ai adoré partager de bons moments et merci à Xiaolin pour nos discussions en anglais qui m'ont été d'un réel soutien.

Un grand merci à Benjamin Le Ouay pour son soutien, ses conseils et pour les bons moments que nous avons passé. J'ai adoré nos petites expériences amusantes en chimie.

Je remercie Yan Wang, Jérémie Silvent et Sandrine Quignard qui m'ont guidé au début de ma thèse et pour leur gentillesse. Merci également à Claudia et Andrea pour leur grande sympathie. J'ai vraiment apprécié travailler en leur compagnie.

Au cours de cette thèse j'ai également rencontré des personnes de l'IMPMC et j'aimerais remercier particulièrement Jean-Michel Guigner qui m'a formée au MET. Je remercie Matthieu Amor pour sa gentillesse et nos discussions sur les bactéries magnétotactiques.

Je souhaiterais remercier toute l'équipe ITODYS, mon deuxième labo où j'ai vraiment apprécié travailler. L'ambiance y est particulièrement chaleureuse grâce aux permanents (Souad Ammar, Fernand Fiévet, Lorette Sicard, Jean-Yves Piquemal, François Chau, Jennifer Peron, Marion Giraud, Sophie Nowak, Ludovic Mouton) et aux non permanents (Thomas, Laurence, Hélène, Jonathan, Firas, Ammal, Samiha, Anen, Tahar, Yassine, Michele et Hudson). Je suis ravie d'avoir pu travailler avec Alice Da Rocha dans le labo bio, merci pour son extrême gentillesse et pour son aide.

J'ai pu rencontrer également Seifhedine, qui reste pour moi une personne sur qui l'on peut compter. Je ne le remercierai jamais assez pour toute son aide et les bons moments qu'on a passé. Je n'oublie pas Ambroise Quesne-Turin et Adeline Rambaud, deux super stagiaires qui m'ont également beaucoup aidé et à qui je souhaite plein de bonnes choses par la suite.

Un grand merci à Isabelle Genois, Nora Abdoul pour leur aide précieuse dans la caractérisation de mes échantillons et Christophe Gatel qui a réalisé de superbes images en holographie électronique sur mes bactéries.
Je tiens à remercier également Claire Valotteau et David Pinto, mes successeurs en bactériologie ainsi que Corinne Pozzo Di Borgo, Hélène Gervais, Patricia Maillot, Laurence Bonnet-Lericque, Tania Leulmi et tout le reste de l'équipe au Collège de France.

Je remercie Insa et Amina, mon frère et ma sœur de cœur que je n'ai pas oublié malgré la distance qui nous sépare.

Merci aussi à ma famille qui m'a soutenue. Merci à ma maman pour sa tendresse et qui a toujours souhaité le meilleur pour moi, merci à mon père à qui je ressemble le plus finalement et qui me comprend par-dessus tout et merci à Vic mon frère chéri avec qui j'ai toujours entretenu une grande complicité. J'aimerais remercier particulièrement mon père pour m'avoir aidé à construire un montage en plexiglas pour maintenir les aimants que j'ai utilisé au cours de ma thèse et sans lequel je n'aurais pas pu mener à bien mes expériences. J'aimerais également remercier Momo pour qui je dois tout et qui m'a guidé depuis le début de notre rencontre.

Sommaire

Sommaire

Introduction générale 11
Chapitre I – Etudes bibliographiques 15
I. Les bactéries magnétotactiques 18
A. Les bactéries du genre *Magnetospirillum* 19
B. Les magnétosomes 20
1. Caractéristiques générales 20
2. Les processus de biominéralisation 22
C. Applications 32
II. Encapsulation cellulaire 33
A. Procédé sol-gel 35
1. La polymérisation inorganique par voie aqueuse 36
2. Propriétés des gels de silice 38
B. La bioencapsulation 38
C. Stratégies développées pour préserver les cellules encapsulées 41
D. Les applications 43
III. Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) 46
A. La magnétite (Fe_3O_4) 46
B. Caractéristique structurale et morphologie des nanoparticules de magnétite 46
C. Propriétés magnétiques de la magnétite 47
1. Transition de Verwey 48
D. Applications 49
E. Synthèses des nanoparticules de magnétite 49
1. Procédé polyol 50
2. Synthèse par thermolyse ou thermo-hydrolyse 53
IV. Effet du champ magnétique sur les organismes vivants 55
A. Les effets sur les systèmes biologiques 56
1. Effets sur les cellules eucaryotes 56
2. Effets sur les cellules procaryotes 58
3. Effets sur la magnéto-réception 60
4. Effets sur les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques 62
Objectifs 65
Chapitre II – Conception des matrices magnétiques pour l'encapsulation 68
I. Synthèse des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) et caractérisations 71

A. Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques par procédé polyol et caractérisations 71
1. Synthèse des nanoparticules par voie polyol 71
2. Caractérisations des nanoparticules synthétisées par voie polyol 73
3. Caractérisations magnétiques des nanoparticules synthétisées par voie polyol 76
4. Charge de surface et dynamique des nanoparticules en suspensions 79
5. Conclusion 83
B. Synthèse de microsphères par voie solvothermale et caractérisations 83
1. Synthèse des nanoparticules par voie solvothermale 83
2. Caractérisations des nanoparticules synthétisées par voie solvothermale 83
3. Caractérisations magnétiques des nanoparticules synthétisées par voie solvothermale 85
4. Conclusion 85
C. Synthèse des nanoparticules monodomaines par thermo-hydrolyse et caractérisations 86
1. Synthèse du précurseur alcoxyde de fer par voie polyol 86
2. Caractérisations du précurseur alcoxyde de fer synthétisé par voie polyol 87
3. Caractérisations magnétiques du précurseur alcoxyde de fer synthétisé par voie polyol 90
4. Synthèse des nanoparticules de magnétite par thermo-hydrolyse 91
5. Caractérisations des nanoparticules de magnétite synthétisées par thermo-hydrolyse 92
6. Caractérisations magnétiques des nanoparticules de magnétite synthétisées par thermo-hydrolyse 96
7. Conclusion 98
D. Bilan 98
II. Elaboration des matrices magnétiques et caractérisations 99
A. Protocoles d'élaboration des gels de silice et des gels magnétiques 99
1. Mode opératoire 99
B. Caractérisations des différents gels 102
1. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 10 nm 102
2. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 400 nm 108
3. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 32, 45 et 50 nm 109
C. Bilan 112
Chapitre III – Encapsulation des bactéries dans des matrices minérales 114
PARTIE I- ENCAPSULATION DES BACTERIES *ESCHERICHIA COLI* 116
I. Procédé d'encapsulation des bactéries *Escherichia coli* 117
A. Description des bactéries *Escherichia coli* 117
B. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées 118

C. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation 119
D. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels 120
II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices 123
A. Numération sur boîtes 124
1. Effet de la concentration en nanoparticules de magnétite de 10 nm sur les bactéries encapsulées 124
2. Effet des particules de magnétite de 400 nm sur les bactéries encapsulées 126
B. Test Alamar Blue 127
C. Dosage de l'ATP 131
1. Viabilité des bactéries en absence d'un champ magnétique 132
2. Viabilité des bactéries en présence d'un champ magnétique 133
3. Production d'ATP en présence et en absence d'un champ magnétique 135
4. Effet du champ magnétique au bout d'1h d'encapsulation 136
D. Microscopie Electronique en Transmission (MET) 136
1. Bactéries encapsulées dans les gels à base de magnétite de 10 nm 136
2. Bactéries encapsulées dans le gel de silice 139
E. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 140
F. Conclusion 141
PARTIE II- ENCAPSULATION DES BACTERIES *MAGNETOSPIRILLUM MAGNETICUM* 143
I. Procédé d'encapsulation des bactéries magnétotactiques 143
A. Description des bactéries *Magnetospirillum magneticum* 143
B. Choix du milieu de culture 144
C. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées 146
D. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation 147
E. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels 148
II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices 150
A. Viabilité des bactéries encapsulées sans magnétosomes 150
1. Numération sur boîtes 150
2. Alamar blue 152
3. Dosage de l'ATP 154
4. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 157
B. Viabilité des bactéries encapsulées avec des magnétosomes 158
1. Numération sur boîtes 159
2. Alamar blue 161

3. Dosage de l'ATP 162
4. Viabilité des bactéries magnétiques et non magnétiques dans les gels de silice 164
5. Microscopie Electronique en Transmission (MET) 165
6. Observations au MEB des AMB-1 avec magnétosomes encapsulées dans les gels 167
C. Détection des magnétosomes par VSM 168
1. Mesures magnétiques au VSM 168
2. Mesures magnétiques au SQUID 169
D. Conclusion 172
III. Bilan 173
Chapitre IV – Effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation 174
I. Procédé d'encapsulation des bactéries pour la production des magnétosomes 176
A. Protocole pour l'encapsulation des bactéries 176
1. Mise en culture des bactéries avant l'encapsulation 176
2. Choix du milieu de culture pour la préparation des suspensions bactériennes avant l'encapsulation 177
3. Préparation de la suspension bactérienne et encapsulation des bactéries 178
4. Suivi de la consommation en oxygène dans les gels 179
5. Premiers tests préliminaires d'encapsulation des cultures de 7 jours 181
B. Suivi des processus de biominéralisation 182
1. Préparation des « suspensions contrôles » pour l'étude des phénomènes de biominéralisation en solution 182
2. Observation macroscopique des suspensions contrôles 182
3. Viabilité des bactéries dans les suspensions contrôles 186
4. Viabilité des bactéries dans les gels 188
II. Etude sur les processus de biominéralisation 190
A. Viabilité des bactéries dans les gels et les suspensions contrôles pour l'étude des processus de biominéralisation 190
B. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées sans magnétosomes 192
1. Observation des bactéries par microscopie électronique en transmission pour l'étude des phénomènes de biominéralisation 193
2. Effet du champ magnétique sur le nombre de cellules contenant des magnétosomes 200
3. Effet du champ magnétique sur le nombre de magnétosomes par cellule 203
4. Suivi de la production des magnétosomes par des mesures du coefficient de magnétisme (Cmag) 204

5. Effet du milieu de culture sur le nombre de magnétosomes et l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique 206
C. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées avec des magnétosomes 209
1. Observation des bactéries par microscopie électronique en transmission pour l'étude des phénomènes de biominéralisation 209
2. Effet du champ magnétique sur le nombre de magnétosomes intracellulaires 214
3. Effet du champ magnétique sur la viabilité des cellules 215
4. Suivi de la production des magnétosomes dans les gels de silice par VSM 215
5. Effet du milieu de culture sur le nombre de magnétosomes et l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique 217
D. Effet des matrices à base de nanoparticules de magnétite monodomaines sur les processus de biominéralisation 219
1. Procédé d'encapsulation 219
2. Observation en microscopie électronique en transmission 219
III. Bilan 226
Conclusion générale 235
Références bibliographiques 239
Annexes 254
PARTIE CARACTERISATIONS DES MATERIAUX 254
PARTIE MICROBIOLOGIE 262

Introduction générale

Introduction générale

Dans notre environnement, le champ magnétique terrestre qualifié de « bouclier protecteur » permet de préserver la vie sur Terre et joue un rôle important dans le système d'autoguidage de certains animaux (Walcott & Green, 1974 ; Zoeger *et al.,* 1980). La découverte d'organismes capables de s'orienter spatialement grâce à un système de perception du champ magnétique, a suscité beaucoup de questions au sujet des mécanismes sensoriels mis en jeux (Walcott *et al.,* 1979). Avec l'avancée croissante des nouvelles technologies, les êtres vivants sont continuellement exposés à d'autres types de champ électromagnétiques d'origine anthropique (téléviseur, antennes à haute tension,…) (WHO, 2006). Beaucoup d'interrogations se sont alors posées au sujet des impacts potentiels de ces champs magnétiques environnants sur les systèmes biologiques et la santé. Une des particularités des champs magnétiques réside dans leur capacité à pénétrer librement dans les tissus biologiques (Hashish *et al.,* 2008). Ils peuvent donc interagir avec les systèmes biologiques selon plusieurs mécanismes : biochimiques, physiques et sensoriels (Amara *et al.,* 2009 ; WHO, 1987 ; Holland *et al.,* 2008). Ces particularités peuvent ainsi conduire à des modifications des processus au niveau cellulaire ainsi que sur la navigation spatiale de certains animaux. Des particules de magnétite (Fe_3O_4) biogénique présentes chez certains organismes agiraient comme un capteur sensoriel jouant le rôle de transducteur du champ magnétique terrestre. Ainsi, le mouvement des cristaux de magnétite permettrait de détecter l'inclinaison, la polarité et l'intensité des champs magnétiques (Kirschvink & Gould 1981 ; Kirschvink *et al.*, 2001, 2010). La découverte de bactéries magnétotactiques possédant des chaînes de cristaux de magnétite a par la suite suscité un grand intérêt pour ces matériaux biogéniques (Blakmore R.P., 1975 ; Frankel & Blakmore, 1989). Ces particules de magnétite alignées en chaîne au sein de la bactérie forment un dipôle magnétique agissant comme l'aiguille d'une boussole microscopique et permettent ainsi l'alignement passif des cellules dans le champ magnétique terrestre (Frankel, 1984 ; Dunin-Borkowski *et al.,* 1998, 2001). Ce type de mécanisme constitue un des exemples sur l'effet de la force d'un champ magnétique sur la biologie et a donc conforté l'hypothèse d'un système sensoriel (Blakemore R. P., 1975 ; Kalmijn & Blakemore 1978 ; Blakemore *et al.,* 1980 ; Kirschvink & Gould 1981 ; Kirschwink *et al.,* 2001).

Plusieurs questions se sont alors posées en ce qui concerne les processus de biominéralisation (minéralisation biologiquement contrôlée) lorsque les êtres vivants sont exposés à différents types de champs magnétiques. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux bactéries magnétotactiques qui en présence d'un champ magnétique terrestre de 50 µT produisent des nanoparticules magnétiques de taille et de forme bien contrôlées (Faivre & Schüler, 2008). Ces

particules de magnétite de haute qualité chimique présentent des propriétés tellement remarquables qu'elles sont source d'inspiration et d'exploitation dans diverses applications (Baumgartner *et al.,* 2013[a,b] ; Prozorov *et al.,* 2013 ; Arakaki *et al.,* 2010 ; Alphandery *et al.,* 2011). Nous nous sommes donc demandés si ces nanoparticules biogéniques pouvaient subir des modifications lorsque les bactéries sont exposées à un champ magnétique statique de force supérieure à celle de la Terre. Les processus de biominéralisation seront-ils influencés en présence de ce type de champ ? Un champ magnétique suffisamment fort pourrait-il stimuler la production des particules biogéniques et moduler la taille, la forme et l'orientation des cristaux au sein de la cellule ? Cependant, ces microorganismes placés hors de leur environnement sont parfois fragiles et nécessitent d'être manipulés dans des conditions optimales pour pouvoir être exploités. Une solution proposée pour protéger ces systèmes biologiques a été l'immobilisation dans des matrices solides (Brasack *et al.,* 2000 ; Finnie *et al.,* 2000 ; Nassif *et al.,* 2002). Ce procédé s'est développé depuis plusieurs années afin de concevoir des matériaux vivants dans lesquels cellules ou biomolécules peuvent être préservées durablement (Coradin *et al.,* 2009). De plus, ce type de matériau peut être fonctionnalisé afin d'étudier les interactions entre le vivant et la matrice. Ainsi des gels de silice peuvent devenir magnétiques par intégration de nanoparticules de magnétite. Il s'agit d'une des approches que nous avons choisie afin d'étudier l'effet d'un champ magnétique sur des cellules immobilisées dans des matrices cytocompatibles. Une deuxième approche a consisté en l'exposition de ces biomatériaux à un champ magnétique statique créé par la force de deux aimants placés de part et d'autre des gels.

Les principaux objectifs de ce travail de thèse consistent en la réalisation de biomatériaux fonctionnels à partir de bactéries immobilisées dans des matrices minérales élaborées par voie sol-gel dans des conditions cytocompatibles pour la préservation des cellules. L'influence du champ magnétique sur les bactéries constitue également un axe important de notre étude. Plusieurs questions se sont posées sur ce point : Un champ magnétique pourrait-il affecter la viabilité des bactéries piégées dans des gels de silice ? Et pourrait-il influencer les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques ? Afin de répondre à ces objectifs, cette thèse s'est construite selon 3 axes d'étude : la conception des matrices magnétiques, le suivi de la viabilité des bactéries immobilisées et l'effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation.

Un premier chapitre bibliographique présentera dans un premier temps les bactéries magnétotactiques et les mécanismes de biominéralisation suscités chez ce type de microorganisme. Des études répertoriées sur l'encapsulation cellulaire permettront de mettre en lumière les différentes possibilités envisagées pour la préservation des cellules dans des matrices minérales

comme la silice. Comme la conception des matrices magnétiques consiste en l'intégration de nanoparticules magnétiques dans le gel de silice, nous avons alors évoqué les particularités des nanoparticules de magnétite d'un point de vue cristallographique et de leurs propriétés magnétiques. Des notions sur le magnétisme ont également été mentionnées afin d'apporter plus de précision sur les matériaux que nous avons utilisés. Enfin quelques études sur les effets potentiels des champs magnétiques sur les organismes vivants permettront de conforter ce pourquoi nous nous sommes intéressés au champ magnétique et sur son impact possible sur les microorganismes.

Un second chapitre sera consacré à la synthèse et à la caractérisation des nanoparticules de magnétite, puis à la conception des gels de silice magnétiques par procédé sol-gel. Afin d'évaluer la cytocompatibilité des matrices minérales magnétiques et non magnétiques, un troisième chapitre présentera les études réalisées sur l'encapsulation des bactéries modèles *Escherichia coli* et des bactéries magnétotactiques *Magnetospirillum magneticum*. Nous nous sommes particulièrement intéressés au maintien de la viabilité des cellules immobilisées sur le long terme. L'encapsulation des bactéries magnétotactiques n'ayant à ce jour pas encore fait l'objet d'une étude, nous permettra de comparer le comportement de ces bactéries avec les *E. coli* très largement utilisées pour l'encapsulation cellulaire. Enfin un quatrième chapitre relatera l'influence de l'encapsulation et du champ magnétique sur la capacité des bactéries magnétotactiques à minéraliser des nanoparticules de magnétite. Nous pourrons ainsi étudier la contribution de l'environnement extracellulaire sur ces processus de biominéralisation.

Chapitre I – Etudes bibliographiques

Chapitre I – Etudes bibliographiques 18
I. Les bactéries magnétotactiques 18
A. Les bactéries du genre *Magnetospirillum* 19
B. Les magnétosomes 20
C. Applications 32
II. Encapsulation cellulaire 33
A. Procédé sol-gel 35
B. La bioencapsulation 38
C. Stratégies développées pour préserver les cellules encapsulées 41
D. Les applications 43
III. Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) 46
A. La magnétite (Fe_3O_4) 46
B. Caractéristique structurale et morphologie des nanoparticules de magnétite 46
C. Propriétés magnétiques de la magnétite 47
D. Applications 49
E. Synthèses des nanoparticules de magnétite 49
IV. Effet du champ magnétique sur les organismes vivants 55
A. Les effets sur les systèmes biologiques 56
Objectifs 65

Dans ce chapitre bibliographique, nous traiterons plusieurs thèmes en lien avec les différents axes d'étude : la conception des matrices magnétiques, le suivi de la viabilité des bactéries immobilisées et l'effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation.

Dans un souci de compréhension, nous présenterons dans un premier temps les bactéries magnétotactiques qui sont au cœur du sujet. Ces microorganismes sont particulièrement fascinants car ils peuvent biominéraliser des cristaux de magnétite de taille et de forme contrôlée et bien organisés au sein de la cellule. Ces minéraux biogéniques entourés d'une membrane lipidique (magnétosomes) comportent des propriétés magnétiques très intéressantes. Alignés en chaîne, ils forment un dipôle magnétique permettant l'alignement passif des cellules dans les lignes du champ magnétique terrestre. Nous verrons également que les processus de biominéralisation restent très énigmatiques et que l'environnement joue un rôle important dans la formation des magnétosomes. Nous évoquerons ensuite les applications potentielles des magnétosomes et également les perspectives de construction de matériaux magnétiques inspirés du vivant en mimant les processus de biominéralisation (biomimétisme). Comme nous souhaitons encapsuler les bactéries dans des matrices de silice, nous avons présenté dans un deuxième temps les différentes études sur la bioencapsulation répertoriant les processus chimiques utilisés afin de préserver les cellules dans un environnement cytocompatible élaboré dans des conditions douces (température ambiante, pH neutre, non toxicité des précurseurs chimiques,…). Nous verrons que la bioencapsulation s'est étendue à une grande variété de cellules (procaryotes et eucaryotes) et que les matrices de silice ont prouvé leur efficacité dans le maintien et la protection des systèmes biologiques. A ce jour, l'encapsulation cellulaire s'ouvre vers de nombreux systèmes appliqués permettant d'exploiter des cellules pour la réalisation de biocapteurs, bioélectrodes, bioréacteurs et systèmes de bioremédiation. Dans un troisième temps, nous décrirons les particularités de la magnétite et ses propriétés magnétiques à l'échelle nanométrique ainsi que ses applications potentielles. Cette partie nous permettra de comprendre les propriétés des matériaux magnétiques utilisés au cours de cette thèse. En effet, la conception des matrices magnétiques pour la bioencapsulation nécessite l'incorporation de nanoparticules de magnétite au sein de la silice. Enfin une dernière partie permettra de faire le lien entre les différents thèmes abordés. Nous répertorierons quelques études réalisées au sujet des effets potentiels des champs magnétiques sur les systèmes biologiques. Nous évoquerons ainsi pourquoi les champs magnétiques sont sujets à de nombreuses études en ce qui concerne les impacts cellulaires d'un point de vue biochimique, leurs effets sur la navigation de certains animaux et sur les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques en suspension. Ces différentes parties bibliographiques conforteront notre choix de travailler sur l'effet du champ magnétique sur des bactéries magnétotactiques piégées dans des matrices de silice.

Chapitre I – Etudes bibliographiques

I. Les bactéries magnétotactiques

En 1963, Salvatore Bellini découvre pour la première fois l'existence de microorganismes issus des sédiments des tourbières pouvant s'orienter dans une direction unique (Bellini S., 1963). Bellini réalise alors que ces bactéries pouvaient se diriger en direction du pôle Nord. Il les qualifia par la suite de « bactéries magnétosensibles ».

Quelques années plus tard en 1974, Richard P. Blakemore réalise que ces microorganismes peuvent suivre la direction du champ magnétique terrestre du Sud au Nord. Suite à ses observations, il nomma ces microorganismes « bactéries magnétotactiques » (Blakemore R.P., 1975). Cette deuxième découverte va alors avoir un impact considérable sur l'étude des bactéries magnétotactiques notamment dans les domaines de la microbiologie mais aussi dans bien d'autres disciplines diverses telles que la géologie, la physique, la minéralogie, la cristallographie, la chimie, la biominéralisation, la biochimie, la limnologie, l'océanographie et l'astrobiologie. L'étude des bactéries magnétotactiques est relativement complexe en raison de l'isolation difficile des cultures pures et de la mise en culture parfois fastidieuse en laboratoire. Jusqu'à ce jour plusieurs souches provenant des eaux douces ont pu être isolées et étudiées telles que les *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (Maratea & Blakemore, 1981), les *M. gryphiswaldense* MSR-1 (Schleifer *et al.,* 1991), les *M. magneticum* AMB-1 (Matsunaga *et al.,* 1991) et les *Desulfovibrio magneticus* RS-1 (Sakaguchi *et al.,* 2002). D'autres bactéries issues des milieux marins ont également été identifiées comme les *Magnetococcus* MC-1 (Frankel *et al.,* 1997), les *Magnetovibrio* MV-1 (Bazylinski *et al.,* 1988) et MV-2 (DeLong *et al.,* 1993). Après 20 ans de recherche sur ces microorganismes depuis la découverte de Blakemore, les études sur la génétique et la biologie moléculaire ont pu débuter.

Les bactéries magnétotactiques sont des procaryotes gram négatif et possèdent des flagelles pour assurer leur déplacement. Elles peuvent pousser soit en micro-oxie soit en anoxie ou bien dans les deux conditions. Elles possèdent un seul système respiratoire pour leur métabolisme et contiennent une enzyme nitrogénase leur permettant de fixer l'azote atmosphérique. Ces microorganismes mésophiles assurent leur développement à des températures modérées entre 20 et 37°C. Les bactéries magnétotactiques présentent une caractéristique qui les distingue de toutes les autres bactéries. Il s'agit de leur capacité à minéraliser des cristaux de magnétite (Fe_3O_4) ou de greigite (Fe_3S_4) intracellulaires. Les minéraux magnétiques biogéniques enveloppés d'une membrane

lipidique sont qualifiés de magnétosomes (Bazylinski & Frankel, 2004 ; Balkwill *et al.,* 1980 ; Gorby *et al.,* 1988 ; Komeili *et al.,* 2004). La taille et la forme des particules biogéniques différent selon les espèces (Fig. 1).

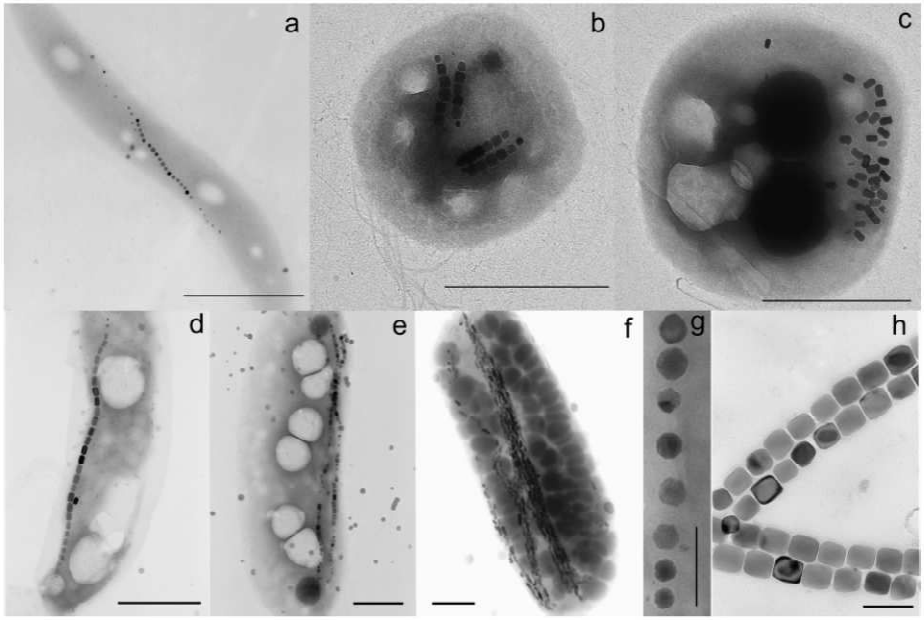


Figure 1 : Images MET de différentes bactéries magnétotactiques avec des chaînes de magnétosomes. (a) spirillum avec une chaîne de magnétosomes cubo-octaédriques ; (b) coccus avec deux chaînes doubles de magnétosomes légèrement prismatiques allongés ; (c) coccus avec des magnétosomes allongés formant des clusters ; (d) vibrio avec des magnétosomes prismatiques allongés ou cubo-octaédriques arrangés en une seule chaîne ; (e) vibrio avec deux chaînes ; (f) bactérie en forme de bâtonnet avec plusieurs chaînes de magnétosomes ; (g) chaîne de magnétosomes chez les spirillum présentés en (a) ; (h) magnétosomes de la bactérie en (b). Barre d'échelle de (a) à (f) : 1 µm et de (g) à (h) : 100 nm (Faivre & Schüler, 2008)

Dans l'environnement, les bactéries magnétotactiques se trouvent dans les eaux douces, saumâtres et marines au niveau de l'interface oxique-anoxique dans la colonne d'eau ou dans les sédiments avec une stratification verticale. Dans cette zone, les bactéries peuvent atteindre une concentration de 10^4 cellules/ml (Bazylinski & Moskowitz, 1997 ; Bazylinski *et al.,* 1995 ; Simmons *et al.,* 2004). Dans les eaux douces, les bactéries identifiées jusqu'à présent ne produisent que des nanoparticules d'oxyde de fer alors que dans les milieux marins, la magnétite et la greigite peuvent être biominéralisées (Frankel *et al.,* 1979 ; Mann *et al.,* 1990).

A. Les bactéries du genre *Magnetospirillum*

Les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Magnetospirillum* et la première bactérie identifiée était associée à la souche *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (Blakemore *et al.,* 1979 ; Maratea & Blakemore, 1981). Celle-ci avait été isolée du marais Cédar à Woods Hole dans le Massachusetts aux Etats-Unis et précède l'isolation en culture pure des bactéries

Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 des sédiments de la rivière Rick en Allemagne (Schleifer *et al.,* 1991). Par la suite, la découverte de Matsunaga a permis d'isoler les *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 issues d'une source d'eau douce à Koganei à proximité de Tokyo au Japon (Matsunaga *et al.,* 1991). Ces bactéries microaérophiles utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons au cours de la respiration. Toutefois, elles sont capables d'adapter leur métabolisme et peuvent convertir les nitrates en diazote gazeux. Ce procédé est appelé dénitrification (Bazylinski & Blakemore, 1983). Le processus de biominéralisation de la magnétite dans les magnétosomes se déroule seulement en condition micro-oxique et/ou anoxique selon les espèces. Les *Magnetospirillum* sont des microorganismes chemo-organo-hétérotrophes c'est-à-dire qu'ils utilisent des molécules organiques pour produire leur énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Seuls certains acides organiques peuvent être utilisés comme source d'électrons et de carbone. Le diazote atmosphérique peut être fixé grâce à l'activité nitrogénase des bactéries (Bazylinski *et al.,* 2000).

B. Les magnétosomes

1. Caractéristiques générales

La formation des magnétosomes est un processus génétiquement contrôlé et leur assemblage en chaîne bien ordonnée confère à la bactérie un micro-capteur magnétique très efficace (Rodgers *et al.,* 1990 ; Schüler & Frankel, 1999). La magnétite biominéralisée dans les magnétosomes possède une excellente pureté chimique et une haute perfection structurale (Bazylinski & Frankel, 2004). La morphologie des cristaux diffère en fonction des espèces et, pour une souche particulière, la forme est constante (Bazylinski *et al.,* 1994). Au cours de la formation des magnétosomes, les grains de petite taille (inférieure à 30 nm) possèdent des faces cristallines arrondies et lisses tandis que les particules matures (supérieures à 30 nm) ont une forme bien définie (Bazylinski & Frankel, 2000). Dans le cas des bactéries *Magnetospirillum*, les cristaux de magnétite sont de forme cubo-octaédrique (Mann *et al.,* 1984). Le contrôle strict de la biominéralisation permet une croissance limitée des magnétosomes jusqu'à une taille spécifique. Ces particularités conduisent à une distribution de taille et de forme restreinte (Devouard *et al.,* 1998 ; Arato *et al.,* 2005 ; Jandacka *et al.,* 2013).

Selon les espèces, la taille des cristaux magnétiques varie entre 35 et 120 nm. (Bazylinski & Moskowitz, 1997 ; Bazylinski *et al.,* 1994 ; Devouard *et al.,* 1998 ; Frankel *et al.,* 1998). Dans cette gamme de tailles, les particules magnétiques sont qualifiées de monodomaines car elles sont stables et présentent une aimantation permanente à température ambiante (rémanence) (Butler &

Banerjee, 1975 ; Diaz-Ricci & Kirschvink, 1992). Les particules monodomaines sont uniformément aimantées et le moment du dipôle magnétique est maximal (égal à l'aimantation à saturation), ce qui leur confère des propriétés magnétiques optimales (Bazylinski & Frankel, 2000). En effet, des grains de taille inférieure à 30 nm ne sont pas stables et l'aimantation fluctue à température ambiante (propriété superparamagnétique). De plus, des particules de taille supérieure à 120 nm présentent plusieurs domaines magnétiques (multidomaines), ce qui conduit à une aimantation non uniforme créant une diminution de l'aimantation rémanente. Les magnétosomes sont arrangés en une ou plusieurs chaînes situées le long de l'axe longitudinal de la bactérie (Bazylinski & Moskowitz, 1997 ; Bazylinski *et al.,* 1995). L'interaction entre les magnétosomes joue un rôle important car elle permet de maximiser le moment magnétique du dipôle de la cellule. Chaque moment magnétique des magnétosomes va s'orienter spontanément de manière parallèle aux autres le long de l'axe de la chaîne pour minimiser l'énergie magnétostatique (Frankel R. B., 1984). La chaîne forme donc un dipôle magnétique constitué de la somme des moments magnétiques de chaque magnétosome. Ainsi les particules alignées vont alors se comporter comme une aiguille d'une boussole en miniature (Frankel R. B., 1984). Grâce à l'alignement des magnétosomes en chaînes, les bactéries sont capables de s'orienter de manière passive le long des lignes du champ géomagnétique (Fig. 2).

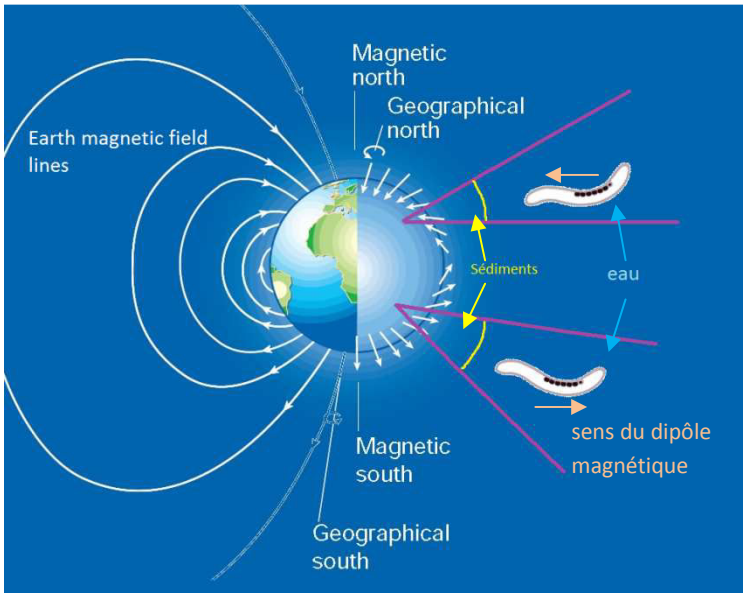


Figure 2 : Bactéries avec des chaînes de magnétosomes formant un dipôle magnétique capable d'aligner la cellule dans le champ magnétique terrestre

Dans l'environnement naturel, ce phénomène appelé magnétotaxie permet aux bactéries de se localiser et de se maintenir à une position optimale dans la colonne d'eau ou les sédiments vers des zones micro-oxiques / oxiques (Ardelean *et al.,* 2008). La magnétotaxie pourrait ainsi aider les bactéries à se diriger parallèlement au champ vers des conditions de croissance optimale. Cette sensibilité au champ magnétique présente un avantage car elle contribue à une recherche dans une

seule dimension plutôt qu'en trois dimensions (Bazylinski & Frankel, 2004). Cependant, ce procédé ne peut être efficace que si les magnétosomes sont ancrés à la cellule. Des magnétosomes libres au sein de la bactérie pourraient s'agglutiner et réduire significativement le moment magnétique du dipôle.

Le véritable tactisme des bactéries magnétotactiques est en fait l'aérotaxie qui est directement couplée à l'alignement magnétique (on parle de magnéto-aérotaxie) assurant le déplacement des bactéries en fonction des variations en oxygène. Les cellules peuvent alors nager de manière parallèle au champ dans des conditions oxiques (dans le sens descendant) et de manière antiparallèle dans la couche anoxique (dans le sens ascendant) grâce à la rotation de leur flagelle (Frankel *et al.,* 1997). Selon les hypothèses de la magnéto-aérotaxie, la direction de rotation du flagelle influence la direction de migration des bactéries le long des lignes de champ.

2. Les processus de biominéralisation

La compréhension des processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques peut être imagée comme l'assemblage des pièces d'un puzzle dont certaines manquent encore à l'heure actuelle. Il réside encore aujourd'hui beaucoup d'incertitudes et chaque espèce possède des spécificités qui lui sont propres. Le contrôle biologique de la minéralisation intracellulaire ne se limite pas seulement à une régulation de la composition, de la taille et de la forme des particules biogéniques. Les mécanismes impliquent des processus hautement contrôlés à des niveaux métaboliques et génétiques pouvant exercer un rôle important dans la nucléation, la croissance et la localisation des minéraux au sein de la bactérie (Bazylinski & Frankel, 2000). Une question subsiste encore à l'heure actuelle : comment l'information génétique de ces microorganismes peut-elle être retranscrite pour former à la perfection des structures minérales extrêmement complexes ? Les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques fascinent et recèlent encore une part de mystère.

Les études des phénomènes de biominéralisation ont été réalisées sur deux espèces des *Magnetospirillum* telles que *M. gryphiswaldense* MSR-1 et *M. magneticum* AMB-1. En effet, ces microorganismes peuvent pousser plus facilement que d'autres bactéries magnétotactiques et leur génome a été séquencé permettant ainsi une meilleure compréhension sur le rôle de certains gènes dans les processus de biominéralisation. La formation des magnétosomes et leur arrangement en chaîne sont des procédés complexes se déroulant en plusieurs étapes (Popa *et al.,* 2009) :

Mécanisme général de la biominéralisation chez *M. gryphiswaldense* :

1- Absorption du Fe (II) et (III)

2- Réduction du Fe (III) durant et après l'absorption

3- Formation de vésicules des magnétosomes pour la conception des minéraux de magnétite

4- Accumulation du Fe (II) dans les vésicules des magnétosomes couplées avec une augmentation du pH intra-vésiculaire

5- Oxydation de la portion de Fe (II) intra-vésiculaire

6- Initiation des particules de magnétite

7- Croissance de la magnétite biogénique immature (superparamagnétique) jusqu'à une taille mature (monodomaine)

8- Organisation des magnétosomes en chaînes

Ces différentes étapes de la biominéralisation ne sont pas encore totalement élucidées et l'ordre de leur déroulement est encore incertain. Nous allons à présent expliciter au mieux les différentes étapes de la biominéralisation.

a) *Absorption du fer*

A des concentration micromolaires, les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} présents dans le milieu extracellulaire vont être absorbés activement (Faivre *et al.,* 2007). L'absorption et la séquestration du fer doivent être strictement contrôlées en raison des effets potentiellement dangereux du fer biodisponible (soluble) (Imlay J. A., 2003). Comme le Fe (III) est insoluble en aérobiose à des pH neutres, les bactéries ont la capacité de produire des sidérophores c'est à dire des ligands de faible poids moléculaire qui vont pouvoir chélater et solubiliser le fer (III) (Neilands J.B., 1991 ; 1995). Les bactéries AMB-1 produisent des chélatants tels que l'hydroxamate et le catéchol pour solubiliser le fer (III) lorsque celui-ci est présent à des concentrations minimales de 6 µM dans le milieu extracellulaire. Le Fer (II) quant à lui est transporté dans les cellules par diffusion (Calugay *et al.,* 2003). Ainsi l'absorption du fer se déroule rapidement et en continu aussi longtemps qu'il est disponible (Blakemore R.P., 1982 ; Schüler & Baeuerlein, 1998 ; Heyen & Schüler, 2003).

b) *Formation des vésicules des magnétosomes*

La membrane des magnétosomes constitue un site de contrôle et de régulation de la biominéralisation de la magnétite (Gorby *et al.,* 1988 ; Schüler & Baeuerlein, 1997). Celle-ci est

composée de protéines, d'acide gras, de glycolipides, sulfolipides et phospholipides (Gorby *et al.,* 1988 ; Grünberg *et al.,* 2004). La minéralisation de la magnétite se déroule après la formation des magnétosomes (Fig. 3). En effet, lorsque les bactéries poussent dans des conditions où le fer est limitant, celles-ci présentent des vésicules vides arrangées en chaînes connectées à la membrane cytoplasmique (Komeili *et al.,* 2006). En présence de fer, la précipitation de la magnétite se déroule progressivement dans les invaginations. Les processus de biominéralisation sont gouvernés par des protéines spécifiques associées à la membrane des magnétosomes. Ces protéines se nomment Mam (magnetosome membrane) et Mms (magnetic particle membrane specific). L'identification des fonctions de ces protéines s'avère être un outil indispensable pour la compréhension des processus de biominéralisation. Ces protéines sont impliquées dans l'absorption du fer dans les cellules et dans les vésicules des magnétosomes et jouent un rôle dans la nucléation, la croissance et l'arrangement des particules de magnétite. La nature et la fonction de ces protéines seront décrites brièvement par la suite.

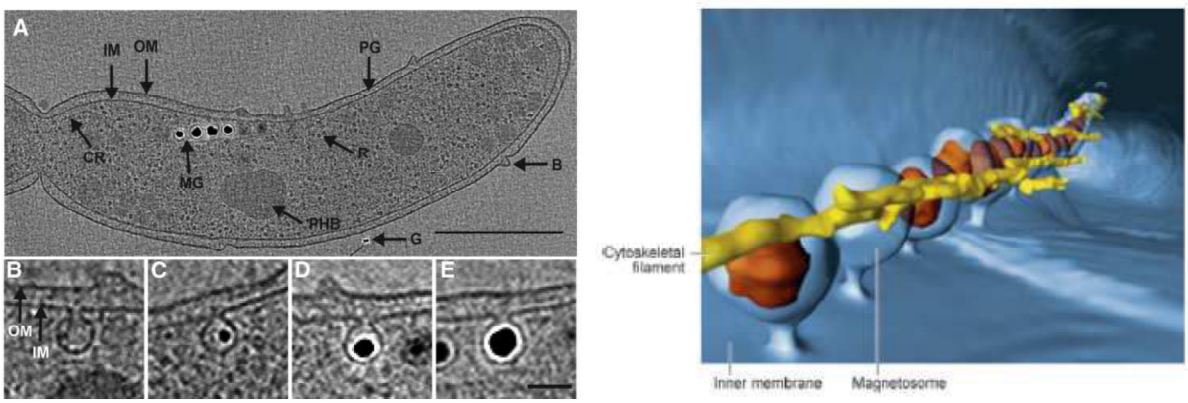


Figure 3 : Image de gauche : Cryotomographie électronique des *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 avec des magnétosomes correspondant à des invaginations de la membrane. (A) OM : membrane externe ; IM : membrane interne (membrane cytoplasmique) ; PG : couche de peptidoglycane ; R : Ribosome ; CR : paquet de chémorécepteurs ; PHB : granules de β hydroxybutyrate ; G : marqueur d'or ; MG : chaîne de magnétosomes. Barre d'échelle : 500 nm. Image B à E : Invaginations des magnétosomes avec de la magnétite. Barre d'échelle : 50 nm (Selon Komeili *et al.,* 2006). Image de droite : Organisation des magnétosomes des AMB-1 en trois dimensions (Image de Zhuo Li & Grant Jensen selon Komeili *et al.,* 2007)

c) *Transport du fer dans les magnétosomes*

Le fer est transporté activement dans les vésicules (détachées de la membrane) ou dans les invaginations des magnétosomes (attachées à la membrane) (Lefèvre & Bazylinsky, 2013). Cependant, ce mécanisme présente encore quelques incertitudes (Faivre & Schüler, 2008). En effet, le transport du fer pourrait se faire par l'intermédiaire du cytoplasme ou bien directement par le périplasme. Dans le cas où la magnétite se forme dans les invaginations permanentes de la

membrane cytoplasmique, le fer serait alors transporté à travers la membrane externe puis entrerait dans le périplasme et serait directement transporté dans l'invagination (Lefèvre & Bazylinsky, 2013). Dans le cas où les vésicules sont dissociées de la membrane, le fer serait donc transporté au travers de la membrane plasmique interne et passerait ensuite la membrane des magnétosomes pour entrer dans les vésicules.

d) *Nucléation et croissance des particules de magnétite dans les magnétosomes*

Une fois que le fer est entré dans les invaginations ou les vésicules, la nucléation et la maturation de la magnétite se produisent. Jusqu'à ce jour, les processus de nucléation et de maturation de la magnétite dans les magnétosomes ne sont pas encore bien compris. Une protéine semblable à la ferritine a été découverte chez les *M. gryphiswaldense* durant la biominéralisation de la magnétite (Faivre *et al.,* 2007). Cette protéine a la capacité de capturer les ions fer et de les libérer de manière contrôlée (Theil E.C., 1987). Il avait alors été suggéré que la formation des cristaux de magnétite pourrait résulter de la co-précipitation rapide du fer (III) et du fer (II) dans les invaginations selon les réactions suivantes :

$$Fe^{2+}\ A + 2\ Fe^{3+}\ B + (2x + y + 4)\ H_2O \rightarrow 2\ Fe(OH)_x^{3-x} + Fe(OH)_y^{2-y} + (2x + y)\ H^+ + A^{2-} + 2\ B^{3-} + 4\ H_2O$$
$$\rightarrow Fe_3O_4 + (2x + y)\ H_2O + 8\ H^+$$

Au cours de ce processus, les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} seraient d'abord liés à la membrane cytoplasmique par des substrats organiques A (inconnu) et B (ferritine). Puis les ligands libèreraient directement les espèces hydroxylées $Fe(OH)_x^{3-x}$ + $Fe(OH)_y^{2-y}$ à l'interface du compartiment des magnétosomes. La co-précipitation de ces espèces conduirait à la formation de la magnétite Fe_3O_4 (Faivre & Schüler, 2008 ; Böttger *et al.,* 2010). Plus récemment, des études sur la formation de la magnétite chez les AMB-1 (Baumgartner *et al.,* 2013[c]) et MSR-1 (Fdez-Gubieda *et al.,* 2013) ont montré que la magnétite se formait grâce à la transformation d'une phase hydroxyde ferrique riche en phosphate, potentiellement la férritine observée auparavant (Faivre *et al.,* 2007), en un composé intermédiaire, la ferrihydrite. Cet oxyde de fer (Fe_2O_3) coordonné avec des molécules d'eau, serait ensuite réduit pour former de la magnétite. La nucléation de la magnétite se déroulerait à l'interface avec la membrane du magnétosome. En effet, des petits cristaux de magnétite ont pu être détectés près de la membrane des magnétosomes ou bien associés à celle-ci (Gorby *et al.,* 1988 ; Faivre *et al.,* 2007). La nucléation se produirait seulement si les concentrations supersaturantes en fer étaient atteintes et serait initiée et contrôlée par tout un ensemble d'enzymes. Il a été démontré que l'oxygène contenu dans les cristaux de magnétite était issu de l'eau et non pas de l'oxygène

moléculaire (Mandernack *et al.,* 1999). Chez les *Magnetospirillum*, la synthèse de la magnétite dépend des conditions micro-oxiques ou anoxiques. Une trop forte concentration en oxygène inhibe la biominéralisation de la magnétite ou bien entraîne la formation de cristaux plus petits ou de forme différente. En ce qui concerne la membrane des magnétosomes matures, il persiste encore à ce jour des incertitudes. En effet, nous ne savons pas si celle-ci reste attachée à la membrane cytoplasmique ou bien si elle se détache et entre dans le cytoplasme chez les *Magnetospirillum* (Katzmann *et al.,* 2010 ; Faivre *et al.,* 2007).

e) *Alignement des magnétosomes en chaîne*

Les magnétosomes matures se forment très rapidement, en 15 min typiquement, et vont s'arranger en chaînes le long de l'axe longitudinal de la bactérie (Staniland *et al.,* 2007). Pour préserver l'assemblage et la maintenance des magnétosomes en chaînes, la cellule a développé une structure ressemblant à un filament d'actine (Actin-like) qui permet l'alignement des particules biogéniques (Komeili *et al.,* 2006 ; Scheffel *et al.,* 2006). Ce réseau cytosquelette de filaments de 3 à 4 nm de diamètre traverse la cellule le long de l'axe longitudinal et se révèle être une structure essentielle pour éviter l'agglomération des magnétosomes (Kobayashi *et al.,* 2006). Le filament nommé MamK va alors collecter les magnétosomes pour les assembler en chaîne. L'adhésion du magnétosome au filament MamK se fait par l'intermédiaire d'une autre protéine appelée MamJ (Komeili *et al.,* 2006 ; Scheffel *et al.,* 2006 ; Scheffel & Schüler, 2007).

Des magnétosomes invaginés à la membrane cytoplasmique permettrait une connexion des chaînes à la cellule et faciliterait ainsi l'alignement de la bactérie dans le champ magnétique. Lorsque les bactéries AMB-1 sont cultivées en absence de fer, les cellules présentent des chaînes de magnétosomes vides (Komeili *et al.,* 2006 ; Komeili *et al.,* 2004). L'ajout de fer conduit à la précipitation de la magnétite dans de multiples magnétosomes adjacents (Komeili *et al.,* 2004). Toutefois, ces mécanismes sont différents chez les MSR-1. En effet, les magnétosomes sembleraient dispersés dans la cellule avant la formation de la magnétite et lorsque se produit la précipitation de la magnétite, les interactions magnétiques inter-particules permettraient l'alignement des magnétosomes en chaînes (Scheffel *et al.,* 2006). Ces différences entre les deux bactéries pourraient s'expliquer soit en raison de conditions différentes de croissance soit par une divergence au niveau des mécanismes moléculaires impliqués dans l'organisation des chaînes des magnétosomes. De plus, ces études ont été réalisées sur des bactéries d'abord privées de fer puis cultivées en présence de fer et le contrôle de la formation de la chaîne au cours d'une croissance normale des cellules n'est pas

encore élucidé. Toutefois, d'autres études plus récentes basées sur des simulations ont suggéré que les interactions magnétiques entre les magnétosomes ne sont pas suffisantes pour obtenir une chaîne (Klumpp & Faivre, 2012). La formation de la chaîne s'effectuerait principalement par le transport actif des magnétosomes puis les interactions magnétiques pourraient stabiliser la chaîne. Le mouvement actif des magnétosomes serait généré par les forces produites lors des processus de polymérisation et dépolymérisation du filament.

Des études réalisées sur les bactéries AMB-1 ont montré que la localisation des filaments MamK serait indépendante des magnétosomes. Cela suggère que les filaments MamK pourraient servir de piste pour le mouvement et le positionnement des magnétosomes de la même façon que les pistes du cytosquelette eucaryote utilisées pour le transport des organelles (Schliwa & Woehlke, 2003 ; Pruyne *et al.,* 2004). Toutefois, le mécanisme de circulation des magnétosomes sur la piste du filament reste énigmatique car la présence d'une protéine motrice comme chez les eucaryotes, n'a pas encore été trouvée. Selon Scheffel *et al.,* 2006, les vésicules des magnétosomes sont toujours arrangées le long du filament MamK tandis que les vésicules vides et les magnétosomes immatures sont localisés à la fin des chaînes pour la souche sauvage (wild-type) et les magnétosomes matures se trouvent au milieu de la cellule. Lorsque la protéine MamJ est absente, les vésicules vides et immatures sont dispersées dans le cytoplasme et dissociées du filament. Selon Scheffel *et al.,* 2006, les protéines MamJ permettent la connexion des vésicules des magnétosomes au filament MamK et seraient impliquées dans la localisation dynamique, MamK dépendante, des magnétosomes au milieu de la cellule. Le mécanisme d'assemblage du filament MamK reste encore insaisissable. La polymérisation de MamK est très dynamique et l'ensemble du réseau est continuellement réarrangé. Il semblerait que MamK prenne naissance au niveau de multiples sites et des courts modules filamenteux pouvant s'assembler pour faire un long filament se formeraient. Les réseaux de paquets filamenteux de 200-250 nm s'allongeraient de manière parallèle à 4 ou 5 magnétosomes individuels et s'associeraient pour former un long filament (Komeili *et al.,* 2006).

Chaque cellule possède un nombre relativement constant de magnétosomes par chaîne et lors de la division cellulaire, la chaîne se coupe au centre pour former deux chaînes dont le nombre de magnétosomes est directement proportionnel à la longueur de la cellule (Staniland *et al.,* 2010). Toutefois, durant chaque cycle cellulaire, le nombre de magnétosomes double au sein de la bactérie. Une incertitude réside encore chez les AMB-1 à propos du cycle cellulaire et si celui-ci régule la production spatiale et temporelle des magnétosomes et leur assemblage en chaîne (Yang *et al.,* 2001[a]). L'environnement pourrait influencer la synthèse de la magnétite et la production de chaînes de magnétosomes ainsi que le cycle de régulation de la production des magnétosomes.

f) *Contrôle biochimique de la formation des magnétosomes*

Beaucoup de protéines de la membrane des magnétosomes seraient impliquées dans la formation de l'invagination ou des vésicules des magnétosomes, dans le transport du fer à l'intérieur des magnétosomes et dans l'arrangement des magnétosomes en chaînes. Le tableau ci-dessous regroupe quelques protéines de la membrane des magnétosomes et leurs fonctions.

Tableau 1 : Liste des protéines présentes dans la membrane du magnétosome :

Famille	Nom	Rôle	Référence
Cation Diffusion Facilitors (CDF) transporteur	MamB MamM MamV (chez MSR-1)	Transport du fer à la membrane des magnétosomes avant la biominéralisation de la magnétite	Abreu *et al.,* 2011 ; Schübbe *et al.,* 2009 ; Grünberg *et al.,* 2001 ; Nakazawa *et al.,* 2009 ; Matsunaga *et al.,* 2005
HtrA- like serine proteases	MamE MamP MamO	Arrangement spécifique des protéines en complexes fonctionnels	Murat *et al.,* 2010 ; Quinlan *et al.,* 2011 ; Yang *et al.,* 2010
Actine Protein	MamK	- Homologue de l'Actin-like protein MreB bactérienne. - Formation de filaments et recrutement des magnétosomes naissants pour former une chaîne et/ou maintien du positionnement correct de la chaîne de magnétosomes matures	Schübbe *et al.,* 2003 ; Taoka *et al.,* 2006 ; Katzmann *et al.,* 2010 ; Katzmann *et al.,* 2011
Generic transporteur	MamH MamN	Pompe à protons durant la précipitation de la magnétite	Jogler & Schüler, 2007
Tetratricopeptide Repeat Protein (TRP)	MamA	- Interactions protéine-protéine susceptibles de se produire au cours de la synthèse des magnétosomes et la construction des chaînes de magnétosomes - Activation des vésicules des magnétosomes	Okuda *et al.,* 1996 ; Okuda & Fukumori, 2001 ; Komeili *et al.,* 2004
	MagA (chez AMB-1)	Absorption du fer dans les magnétosomes	Matsunaga T., 1997

D'autres protéines jouent un rôle important dans la formation des cristaux de magnétite dans les magnétosomes. Chez les AMB-1, la protéine Mms6 liée à la membrane des magnétosomes exercerait une activité dans la liaison du fer et aurait un effet sur la morphologie des cristaux en croissance. En effet, des études in vitro ont montré qu'elle faciliterait la formation de particules

uniformes de 30 nm (Arakaki *et al.,* 2003 ; Prozorov *et al.,* 2007). Scheffel et ses équipiers ont montré qu'il existait des protéines hydrophobes MamG, MamF, MamD et MamC qui permettraient le contrôle de la taille des cristaux de magnétite chez les *M. gryphiswaldense* (Scheffel *et al.,* 2008). Ces protéines seraient fermement liées à la membrane des magnétosomes. La figure 4 nous présente un schéma hypothétique des mécanismes de biominéralisation montrant l'absorption du fer, la formation des magnétosomes sous forme d'invagination ou de vésicules et l'implication des différentes protéines.

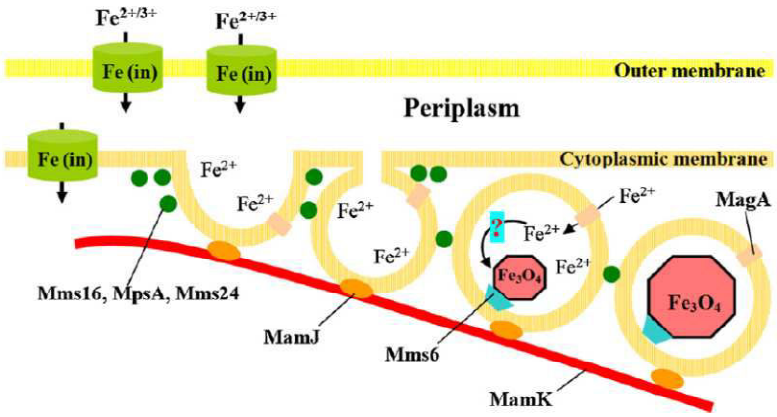


Figure 4 : Schéma hypothétique des mécanismes de biominéralisation de la magnétite (Yan *et al.,* 2012)

g) *Influence des facteurs environnementaux sur les magnétosomes*

Très récemment, de nouvelles espèces de bactéries magnétotactiques ont été découvertes. Il s'agit de bactéries extrêmophiles (thermophile et alcalinophile) capables de produire des magnétosomes similaires à ceux obtenus dans des conditions modérées (Bazylinski & Lefevre, 2013). Selon Faivre *et al.,* 2008, la physiologie cellulaire et les caractéristiques physiques et microstructurales de la magnétite biogénique peuvent être significativement impactées par des variations environnementales telles que la biodisponibilité du fer, le pH et la température par exemple.

<u>Effet de la concentration en fer, du pH, de la température et des chélatants</u>

La biodisponibilité du fer peut affecter la taille et la morphologie des magnétosomes matures chez les *M. grypphiswaldense* (Faivre *et al.,* 2008). Les MSR-1 poussent dans des conditions optimales à pH 7 à 28°C (Moiescu *et al.,* 2011). Lorsque la température et le pH changent (à 4 et 35°C et à pH 5 et 9), le contrôle de la biominéralisation est altéré et conduit à des modifications de la taille et de la

forme des cristaux. Pour une température de 28°C et un pH de 9, la magnétite biogénique prendrait une forme pyramidale qui n'a encore jamais été observée dans les systèmes biotiques et abiotiques. Lorsque la température change à 4 ou 35°C durant la croissance des magnétosomes, il a été montré que celle-ci inhibait totalement la synthèse des magnétosomes tandis que des températures de 10 et 20°C n'affectent pas la taille ni la forme des particules. Il semblerait donc que le pH externe ait un impact important sur le nombre, la taille et la morphologie de la magnétite biogénique tandis que la température pourrait conditionner la synthèse ou non des particules.

Une étude réalisée sur des bactéries *M. magneticum* a pu montrer un effet des agents chélatant du fer comme l'EDTA et la rhodamine B par exemple, sur les cultures et la production des magnétosomes (Alphandéry *et al.,* 2012). En présence de ces agents chélatant, la croissance des cellules et la production des magnétosomes étaient stimulées. Comme les ligands affectent la spéciation du fer III et favorisent sa biodisponibilité (Reichard *et al.,* 2007), ceux-ci permettraient aux cellules de produire des magnétosomes de taille plus importante et des chaînes plus longues.

Effet des impuretés chimiques

D'après Staniland *et al.,* 2008, les souches *Magnetospirillum* pourraient produire des magnétosomes contenant du cobalt, ce qui conduirait à une légère augmentation de la taille et une distribution de taille plus restreinte. Le cobalt se trouvait principalement à la surface des particules, suggérant ainsi que le fer est le constituant essentiel privilégié des magnétosomes. Ces particules présentaient des propriétés magnétiques améliorées avec une coercivité plus élevée. Des études ont montré par la suite qu'une espèce non cultivable issue du lagon côtier de Rio de Janeiro pouvait incorporer de manière homogène le manganèse dans la structure des magnétosomes (Keim *et al.,* 2009).

Effet de l'oxygène

La majorité des bactéries magnétotactiques possèdent un métabolisme respiratoire micro-oxique et/ou anoxique. Il a été démontré que les concentrations en oxygène influençaient grandement la synthèse de la magnétite des magnétosomes (Schüler & Baeuerlein, 1998 ; Heyen & Schüler, 2003). Lorsque les concentrations en oxygène sont trop élevées, les particules de magnétite des AMB-1 sont plus petites (25+/- 4 nm voire 10 nm) et possèdent une forme sphéroïde et non euhédrique comme pour les magnétosomes normaux dont la taille est de 59+/- 5 nm (Popa *et al.,* 2009). Les cellules placées en présence de 45 µM d'oxygène et sous une agitation de 150 rpm présentaient 95% de particules immatures. Une concentration de 45 µM en oxygène aqueux ne semble pas inhiber la nucléation mais seulement la croissance des particules. Pour des concentrations supérieures à 100 µM en oxygène aqueux, la formation des particules biogéniques est

fortement inhibée. Cependant il semblerait que les bactéries poussent mieux entre 100-225 µM d'oxygène aqueux pour les cultures sous agitation comparées aux cellules exposées à de plus faibles concentrations en oxygène. L'inhibition de la croissance des particules pourrait être liée à un stress oxydatif (Heyen & Schüler, 2003 ; Matsunaga *et al.,* 1991). Les bactéries peuvent stocker le fer dans les granules de ferritine (Bertani *et al.,* 1997) mais également dans des vacuoles enrichies en phosphate de fer amorphe (Cox *et al.,* 2002). Ces processus de stockage pourraient alors être contrôlés lors d'un stress oxydatif et seraient directement connectés à la croissance des particules de magnétite. Les études de Li & Pan 2012 ont confirmé que la présence de fortes concentrations en oxygène diminuait le nombre et la taille des particules chez les AMB-1.

Effet du champ magnétique extérieur

La présence d'un champ magnétique plus fort que celui exercé par la Terre pourrait influencer le nombre de magnétosomes au sein des bactéries ainsi que la forme des cristaux et l'arrangement de ceux-ci en chaînes (Wang *et al.,* 2009[a,b] ; Pan *et al.,* 2010 ; Wang *et al.,* 2008[a,b]). Les études réalisées sur ce sujet seront décrites dans la partie concernant l'effet du champ magnétique sur les organismes vivants.

Effet de la concentration en nutriments

Pour tout type de cellules, on peut citer parmi les nutriments essentiels le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore, le soufre et le fer. Lorsque le milieu est limité en sources carbonées, les cellules poussent et produisent des magnétosomes plus lentement par rapport à celles qui ne sont pas limitées en carbone (Naresh *et al.,* 2012). Comme il a été démontré précédemment, l'oxygène et le fer jouent un rôle crucial au niveau de la formation des magnétosomes.

Durant la phase de latence et de croissance, la cellule a besoin d'azote pour former les protéines permettant l'assemblage des vésicules des magnétosomes et le fer est essentiel pour la production des magnétosomes (Naresh *et al.,* 2012). Dans les sédiments lacustres, la concentration en magnétosomes et le pourcentage total de carbone sont corrélés, ce qui suggère que la production des magnétosomes par les bactéries magnétotactiques dépend de l'apport global en carbone (Snowball *et al.,* 1999). Deux autres paramètres chimiques tels que la salinité et les nitrates peuvent également influencer la production des magnétosomes (Simmons *et al.,* 2004 ; Jogler *et al.,* 2010 ; Lin & Pan, 2010).

C. Applications

Les magnétosomes extraits des bactéries magnétotactiques présentent de nombreuses possibilités d'applications dans les domaines des nanotechnologies et des biotechnologies. Ces particules magnétiques monocristallines possèdent une taille qui est particulièrement difficile à obtenir par synthèse chimique. Les magnétosomes présentent de nombreux avantages en raison de la distribution de taille restreinte des particules biogéniques et de leur morphologie uniforme. Parmi les applications potentielles, on retrouve la séparation magnétique, le diagnostic, la détection d'anticorps et l'extraction d'ADN. La membrane des magnétosomes constitue également un très bon outil pour la fonctionnalisation en surface.

Les bactéries magnétotactiques peuvent également être utilisées dans les systèmes de dépollution. L'élimination des métaux lourds et des radionucléides des eaux usées a été suggéré pour la première fois par Bahaj *et al.* (1994, 1998[a], 1991, 1998[b]). Ainsi il a été montré que certaines bactéries magnétotactiques pouvaient éliminer les ions Au (III) et les précipiter en particules d'or autours de leur membrane externe (Song *et al.,* 2008 ; Cai *et al.,* 2011) (Fig. 5).

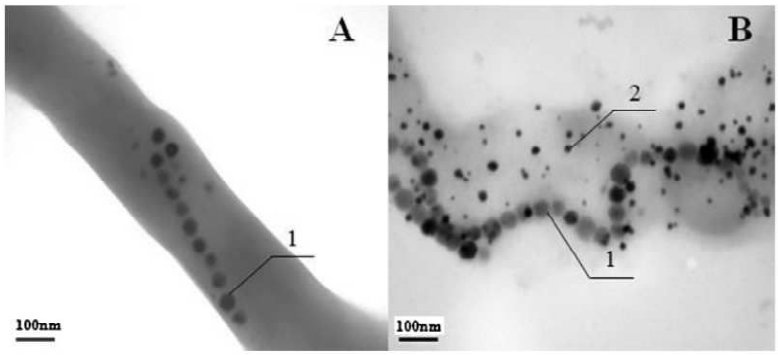


Figure 5 : (A) Image MET de bactéries MSR-1 avant la biosorption d'or. La particule désignée par le n°1 correspond à un magnétosome. (B) Image MET de bactéries MSR-1 et de nanoparticules d'or (n°2) formées en surface après biosorption (Cai *et al.,* 2011)

Toutefois, pour des applications industrielles, les bactéries magnétotactiques doivent être cultivées dans des fermenteurs afin d'augmenter le nombre de cellules ainsi que la quantité de magnétosomes. L'optimisation des conditions de culture pour obtenir une biomasse suffisante constitue donc une clef de voûte avant l'exploitation de ces microorganismes à l'échelle industrielle. Les applications dans le domaine biomédical pour le traitement des cancers présentent de grands enjeux. En effet, les magnétosomes sans purification constituent un immunogène important car ils proviennent de bactéries. Utilisés tels quels, ils peuvent donc provoquer une réaction immunitaire ; c'est pourquoi une purification parfaite est exigée après leur extraction des cellules. Des études ont montré que les chaînes des magnétosomes issues des bactéries AMB-1 présentaient des propriétés très intéressantes dans l'élimination des tumeurs par un traitement en hyperthermie. Lorsque ces

particules sont appliquées au niveau de la tumeur sous la peau d'une souris puis chauffées au moyen d'un champ magnétique alternatif, les résultats ont montré que la tumeur disparaissait après 1 mois (Alphandery *et al.,* 2011).

Par la suite, l'approche biomimétique s'est développée afin de s'affranchir des problèmes liés à l'extraction et à la purification des magnétosomes et permettrait l'élaboration de matériaux fonctionnels très diversifiés. Les nanomatériaux bioinspirés possèdent des structures et des compositions pouvant être façonnées pour présenter des propriétés magnétiques contrôlées et des comportements spécifiques pour une application donnée. Ainsi, les particules de magnétite biogéniques sont au cœur de grandes sources d'inspiration. L'approche biomimétique consisterait en l'utilisation d'enzymes minéralisatrices des bactéries magnétotactiques pour permettre la synthèse de particules magnétiques uniformes de taille et de forme désirées. Cette méthode éviterait donc toute réaction immunitaire liée à l'utilisation d'objets microbiologiques comme les magnétosomes pour des applications biomédicales. Dans le domaine de l'électronique et notamment pour le stockage de données, des matériaux magnétiques nanostructurés sont utilisés. Mais étant donnée la forte demande de bits magnétiques de plus en plus petits pour des densités de stockage de données plus importantes dans un espace donné, l'utilisation de particules monodomaines est solicitée (Frey *et al.,* 2011). Le développement de synthèses de matériaux magnétiques utilisant les protéines de la membrane des magnétosomes pourraient ainsi contribuer à l'amélioration des supports de stockage électroniques (Galloway *et al.,* 2012[a,b]). De plus, les matériaux bioinspirés pourraient également être utilisés dans toutes les applications citées auparavant ainsi que pour la libération ciblée de médicaments et de gènes et pour le marquage cellulaire (Tartaj *et al.,* 2003 ; Xie *et al.,* 2011 ; Gao *et al.,* 2009).

II. Encapsulation cellulaire

Les systèmes biologiques présentent un grand intérêt dans le développement de nouvelles technologies. Au sein des organismes vivants, se déroulent une multitude de réactions physico-chimiques faisant intervenir des enzymes, protéines, anticorps,... tous présentant une fonction différente contribuant au bon fonctionnement des cellules. Certaines biomolécules présentent une activité catalytique ou une capacité de reconnaissance spécifique d'un substrat très intéressante pour l'élaboration de biocapteurs et de catalyseurs. De plus, la capacité de dépollution de certains microorganismes a suscité un intérêt majeur dans la construction de systèmes de bioremédiation. La découverte d'organismes vivants pouvant minéraliser des structures complexes à base de silice (diatomées) et des particules diverses à base d'oxyde de fer, d'or et d'argent (bactéries

magnétotactiques, microalgues, cyanobactéries) constitue une nouvelle voie vers l'élaboration de procédés de synthèse biocontrôlée et, de ce fait, dans la création de bioréacteurs (Silva *et al.,* 2013 ; Sicard *et al.,* 2010 ; Brayner *et al.,* 2007). Une question s'est alors posée : comment exploiter ces différentes particularités biologiques tout en préservant leur fonction en évitant leur dénaturation et une trop grande sensibilité au milieu extérieur ? L'utilisation de ces systèmes biologiques en science des matériaux constitue donc un véritable challenge. Afin de protéger et stabiliser ces entités biologiques pour l'élaboration de matériaux fonctionnels, l'encapsulation a été envisagée dans des matrices solides. Ce procédé s'appelle la bioencapsulation. Les premiers matériaux conçus pour l'immobilisation d'espèces biologiques étaient constitués de biopolymères comme l'agar et l'alginate pour assurer le maintien de l'activité biologique dans des matrices biocompatibles (Muralidhar *et al.,* 2001 ; Yokoyama *et al.,* 1990). Puis, par la suite, s'est développée une nouvelle technique d'encapsulation dans des matrices inorganiques biocompatibles élaborées par voie sol-gel. Ces matériaux présentent des propriétés très intéressantes telles qu'une meilleure stabilité chimique, de bonnes propriétés mécaniques et une porosité contrôlée pour permettre la diffusion des molécules au sein du gel. L'utilisation de la silice pour obtenir des gels dans des conditions de "chimie douce" possède plusieurs avantages. Les matrices de silice sont biocompatibles, transparentes pour permettre la diffusion de la lumière vers les microorganismes photosynthétiques et offrent un environnement inerte non biodégradable.

La première immobilisation de biomolécules dans des gels de silice a été réalisée en 1955 (Dickey F.H., 1955). Puis en 1971, une autre publication parut sur l'encapsulation de la trypsine dans un matériau inorganique (Johnson & Whateley, 1971). L'immobilisation des cellules dans des matrices de silice a d'abord été entreprise dans le but de mimer les processus de fossilisation (Walters *et al.,* 1977). Puis dans les années 80, Carturan et son équipe se sont intéressés à l'encapsulation des levures *Saccaromyces cerevisiae* dans des gels de silice (Carturan *et al.,* 1989). Leurs travaux ont pu mettre en évidence l'influence du précurseur alcoxyde (tetraethoxysilane) et de la production de sous produits (ethanol) au cours du procédé d'encapsulation, l'effet de la gélification sur la viabilité des cellules, l'effet de la densité cellulaire et de la préservation des cellules sur le long terme dans un gel en évolution constante au cours du vieillissement (compaction). Depuis plus de 20 ans, cette thématique s'est développée de manière considérable et l'intégration de biomolécules (enzymes, anticorps,…) et de cellules de plus en plus diversifiées (bactéries, cyanobactéries, algues, protistes, champignons, cellules de mammifère,…) a pu être réalisée dans des matériaux élaborés selon le procédé sol-gel (Coradin *et al.,* 2009). Les processus de bioencapsulation constituent à ce jour une thématique de recherche dans le domaine de la biotechnologie pour l'élaboration de biocapteurs et de bioréacteurs et dans le domaine de la médecine (ingénierie tissulaire) (Ben-Yoav *et al.,* 2011 ; Eibl *et al.,* 2010 ; Chapekar M. S., 2000).

A. Procédé sol-gel

Le procédé sol-gel est une méthode de synthèse effectuée dans des conditions douces permettant la formation d'une phase minérale par hydrolyse et condensation de précurseurs solubles dont la polymérisation inorganique conduit à un réseau d'oxydes métalliques (Brinker & Scherer, 1990).

Lors de la première étape, il se produit une hydrolyse et une condensation des précurseurs en solution, composés d'alcoxydes métalliques (voie alcoxyde) ou de sels métalliques (voie aqueuse) (Fig. 6). Des particules de taille nanométrique vont ainsi se former et constituer une suspension colloïdale nommée « sol ». Comme ces particules sont de très petites tailles dans la suspension colloïdale, les forces gravitationnelles sont négligeables. Les particules sont donc principalement soumises à des interactions générées par les forces de Van der Waals et les charges de surface. La polymérisation induit la formation d'agrégats et de chaînes qui vont contribuer à augmenter la viscosité du sol, ce qui conduit à un « gel » tridimensionnel (étape 2). La coexistence d'une phase solide et liquide au sein des gels, confère une certaine stabilité structurale évitant ainsi son effondrement et permettant une bonne élasticité. La phase liquide peut être séchée par point critique pour former un aérogel conservant la structure et la porosité du gel initial (étape 3a) ou bien elle peut être évaporée à température ambiante pour former un xérogel avec un effondrement de la structure (étape 3b).

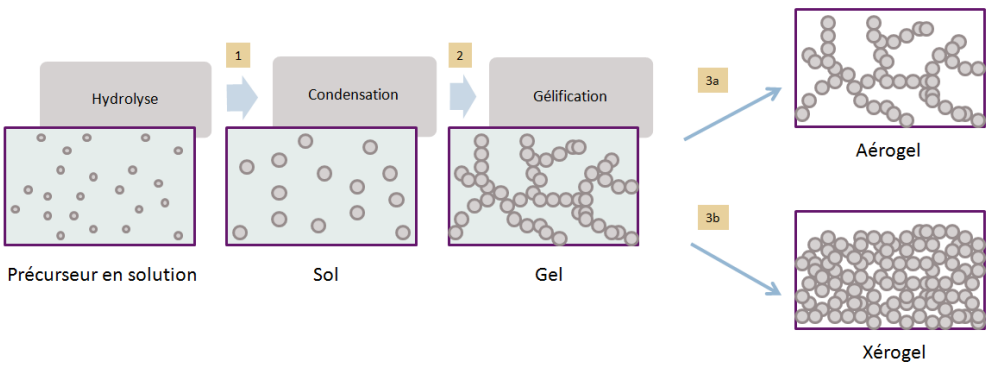


Figure 6 : Etapes de formation d'un gel à partir d'un précurseur en solution

Au cours du vieillissement, la structure et les propriétés du gel évoluent. La formation de liaisons ou l'attraction entre les particules conduisent à une contraction du réseau et à une expulsion du liquide au travers des pores. Ce phénomène est appelé synérèse.

Les gels de silice peuvent être obtenus par voie alcoolique ou bien par voie aqueuse. Le premier procédé nécessite l'utilisation d'un précurseur alcoxyde de silice comme le tétraméthoxysilane (TMOS, $Si(OCH_3)_4$) et le tétraethoxysilane (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$). Dans ce cas, la formation du gel se fait par hydrolyse et condensation avec libération de molécules d'eau et d'alcool au cours du processus. Cependant, nous décrirons seulement le deuxième procédé par voie aqueuse qui est plus propice pour l'encapsulation des microorganismes en raison de l'absence de production d'alcool au cours de la condensation.

1. La polymérisation inorganique par voie aqueuse

Lorsque des sels métalliques sont ajoutés en solution aqueuse, ceux-ci vont se dissoudre et les cations métalliques libérés vont ensuite s'entourer d'une couche de molécules d'eau formant une sphère d'hydratation (Jolivet *et al.,* 1994). Les cations peuvent se coordonner à différents ligands : aquo (H_2O), hydroxo (OH^-) et oxo (O_2^-). L'apparition de ces différentes espèces hydrolysées dépend notamment de l'électronégativité, de la charge et de la taille de l'ion métallique ainsi que du pH de la solution (Livage *et al.,* 1988). Il se produit alors les équilibres suivants en solution :

$$[M(OH_2)]^{z+} \rightleftarrows [M\text{-}OH]^{(z-1)+} + H^+ \rightleftarrows [M{=}O]^{(z-2)+} + 2H^+$$

Les effets de la charge du cation et du pH sont présentés dans le diagramme suivant où apparaissent trois domaines correspondant aux ions aquo, hydroxo et oxo (Kepert D. L., 1972 ; Jorgensen C. K., 1963) :

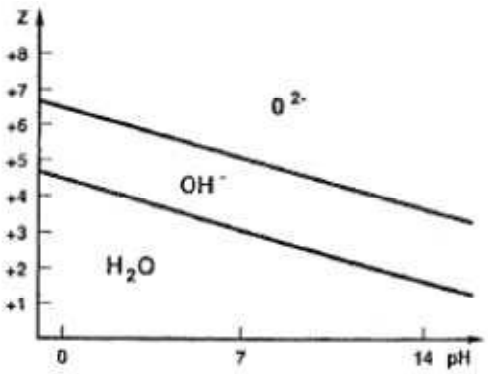


Figure 7 : Diagramme présentant la charge cationique en fonction du pH et montrant les domaines des espèces aquo, hydroxo et oxo (Kepert *et al.,* 1972)

La distribution des espèces aqueuses des silicates est représentée dans la figure ci-dessous en fonction du pH (Fig. 8).

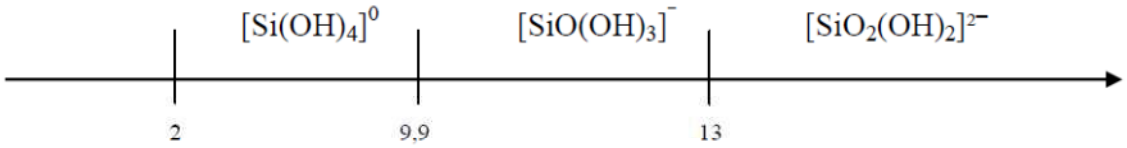


Figure 8 : Domaines de prédominance des espèces siliciques en fonction du pH

En acidifiant une solution de silicate de sodium (Na_2SiO_3), on peut ainsi obtenir de l'acide silicique $Si(OH)_4$ selon la réaction suivante :

$$Na_2SiO_3 + H_2O + 2\ HCl \rightarrow Si(OH)_4 + 2\ NaCl$$

La solution de silicate de sodium initialement introduite contient des espèces $Si(OH)_3^-$. L'acidification conduit donc à la génération de précurseurs de charges nulles $Si(OH)_4$ qui vont alors ensuite pouvoir condenser pour former des particules de silice (SiO_2). Lorsque les espèces hydroxylées sont présentes, la condensation se produit selon la réaction suivante :

$$M - OH + HO - M \rightarrow M - \overset{\overset{H}{|}}{O} - M - OH \text{ (olation)}$$

$$\rightarrow M - O - M + H_2O \text{ (oxolation)}$$

Durant la réaction d'olation, des ponts hydroxyls (OH) vont se former entre deux centres métalliques (Rollinsen C. L., 1956). La condensation se poursuit par la formation de ponts oxygénés (Si – O – Si) et la libération de molécules d'eau (oxolation).

Les réactions de condensation sont fortement dépendantes de la nature de l'ion métallique, de sa concentration et du pH de la solution (Jolivet, J.-P., 2000). La croissance des espèces colloïdales conduit à la formation d'un sol. Les particules de silice vont alors grossir davantage et s'agréger pour former des chaînes conduisant à un réseau.

Selon Iler R. K., 1979, la polymérisation se déroule en 3 étapes :

1- Polymérisation des monomères (M - OH) pour former des particules
2- Croissance des particules
3- Raccordement des particules en chaînes puis formation d'un réseau qui va s'étendre dans le milieu liquide pour donner un gel

2. Propriétés des gels de silice

a) *Influence du pH*

Lorsque les gels sont formés à un pH supérieur à 7, les particules sont soumises à des forces électrostatiques et peuvent donc être redissous dans l'eau tandis que pour des pH inférieurs ou égaux à 7, la gélification est irréversible et les particules sont liées par des liaisons covalentes (Munoz-Agado & Gregorkiewitz, 1997). Le pH influence donc la nature du gel mais également le temps de gélification. En effet, le temps de formation du gel augmente pour des pH basiques entre 8 et 9 en raison de l'augmentation des charges de surface et des répulsions (Knoblich & Gerber, 2001). Le temps de gel diminue lorsqu'on augmente le pH entre 2 et 6 en raison des réactions de condensation catalysées par la présence des groupements OH^-. Au point de charge nulle (PCN) à pH 2, la formation du gel est très lente tandis qu'elle est très rapide à pH 7.

b) *Influence de la concentration en silice*

La concentration en silice influence directement le temps de gélification. Ainsi pour des concentrations élevées, le gel va se former plus rapidement en raison du rapprochement plus aisé des oligomères (molécules constituées d'un petit nombre de monomères), ce qui facilite leur agrégation. La concentration en silice peut également impacter les propriétés mécaniques des gels qui seront donc plus rigides (cohésion forte) lorsque les concentrations sont élevées (Hamouda & Amiri, 2014).

c) *Influence de la température*

Une augmentation de la température conduit à une diminution du temps de gel. Pour une concentration et un pH fixes, le temps de gel peut être contrôlé en modulant la température (Jurinak & Summers, 1991 ; Hamouda & Amiri, 2014).

B. La bioencapsulation

En pratique, le passage d'un sol à un gel se réalise au moyen d'une solution de précurseurs (alcoxydes métalliques) préalablement hydrolysés pour permettre la formation de nanoparticules à base d'oxyde métallique (sol). La transition sol-gel s'effectue via les réactions de polymérisation

conduisant à la formation d'un gel minéral solide et poreux structuré par un embranchement de chaînes formant un réseau tridimensionnel. Pour la bioencapsulation, les cellules en suspension dans un tampon sont ajoutées après l'hydrolyse du précurseur. Les premières études réalisées sur l'encapsulation cellulaire consistaient en l'utilisation de précurseurs alcoxyde de silice (TEOS) en présence d'éthanol et d'eau (Carturan *et al.,* 1989). L'immobilisation des levures *Saccharomyces cerevisiae* tolérant les milieux acides et contenant de l'alcool avait été promotrice dans les conditions de réactions sol-gel par la voie alcoxyde et la viabilité des cellules avait été préservée. Cependant, cette étude a pu mettre en évidence l'intérêt d'utiliser une autre voie permettant la formation d'un gel dans des conditions cytocompatibles pour tout type de cellules. L'utilisation d'éthanol (ou de méthanol) comme co-solvants ou sous produits de la réaction d'hydrolyse et de condensation des alcoxydes de silice a très vite été identifiée comme source majeure pouvant conduire à la mort des cellules (Coiffier *et al.,* 2001). D'autres alternatives ont alors été proposées pour résoudre ce problème par une évaporation de l'éthanol formé lors des processus de condensation ou par l'utilisation de précurseurs aqueux tels que les sels de silicates de sodium et la silice colloïdale (Brasack *et al.,* 2000 ; Finnie *et al.,* 2000 ; Nassif *et al.,* 2002).

La voie aqueuse utilisant des sels (silicates de sodium) plutôt que des alcoxydes s'est révélée être la meilleure alternative. Des bactéries méthanotrophes *Methylomonas* souche GYJ3 ont pu être immobilisées dans des matrices réalisées à partir de précurseurs de silicate de sodium (Chen *et al.,* 2004). Par cette approche, une solution aqueuse de silicate de sodium est acidifiée afin de permettre la condensation de la silice et la formation du gel. Cependant, cette méthode a la particularité de générer des sels (NaCl) produisant ainsi une augmentation de la force ionique pouvant affecter la viabilité des bactéries et les gels obtenus présentent une trop faible cohésion. Une autre approche a permis de s'affranchir de la présence des ions sodium grâce à l'utilisation de la silice colloïdale (Ludox) pour l'encapsulation de bactéries sulfato-réductrices (Finnie *et al.,* 2000). Cependant, là encore les gels obtenus présentaient une faible stabilité. Pour résoudre ces problèmes, les gels ont par la suite été conçus en mélangeant des silicates de sodium avec de la silice colloïdale. Ainsi en diminuant les proportions de silicate de sodium et en augmentant la concentration de la silice par ajout de ludox HS-40 (silice colloïdale), il a été possible de concevoir des gels mécaniquement stables tout en diminuant les concentrations en sels (Coiffier *et al.*, 2001 ; Nassif *et al.,* 2002). Au cours de ce procédé, les nanoparticules de silice sont « cimentées » par les espèces silicatées en train de condenser (Fig. 9).

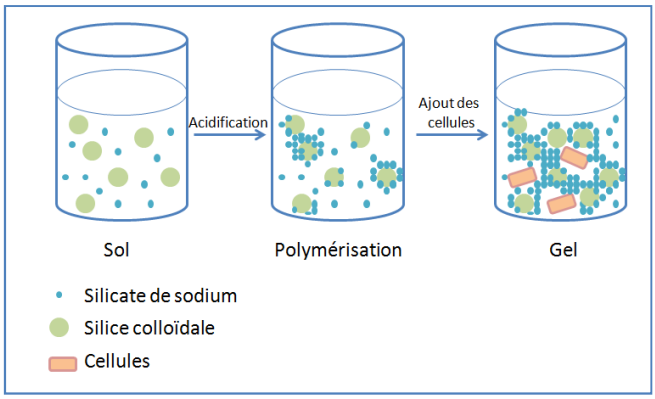


Figure 9 : Processus de formation du gel à partir de silicate de sodium et de silice colloïdale

La stabilité mécanique de ce type de gel peut être optimisée en modulant le ratio silicate/colloïdes. Ainsi une diminution de la concentration en silice colloïdale entraîne une meilleure stabilité mécanique (Perullini *et al.,* 2011).

D'autres types de gels basés sur une approche colloïdale ont pu être élaborés en utilisant des particules de boehmite (AlOOH), d'oxyhydroxyde de fer et d'oxyhydroxyde de zirconium afin de s'affranchir de la présence de sels et d'alcool (Amoura *et al.,* 2007 ; 2009 ; 2010). Ces nouveaux matériaux offrent de nouvelles perspectives en raison de leurs propriétés catalytiques, magnétiques et d'adsorption des ions métalliques présents par exemple dans les eaux polluées. La viabilité des bactéries *E.coli* était préservée dans ces matrices mis à part celle composée d'oxyhydroxyde de zirconium en raison de sa toxicité. Des gels à base de dioxyde de titane ont pu être également conçus par une approche colloïdale (Kessler *et al.,* 2008). Les taux de viabilité dépendaient notamment du type de cellules encapsulées. Tandis que les bactéries *Arthrobacter chlorophenolicus* mourraient rapidement, les levures *Pichia anomala* J121 quant à elles survivaient beaucoup mieux. Par ces différentes approches (à partir de sels de silice et colloïdale), différents types de microorganismes ont pu être encapsulés (Fig. 10).

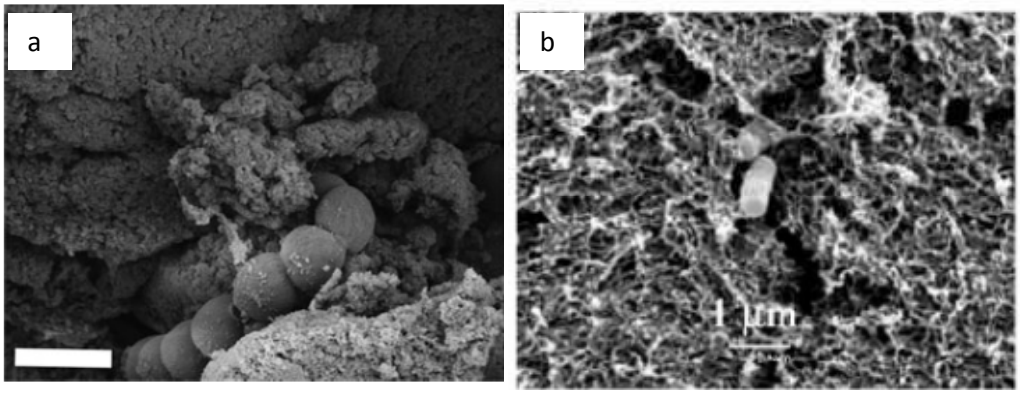


Figure 10 : (a) microalgue dans un gel de silice (barre d'échelle : 5 µm) et (b) bactéries *E.coli* encapsulées dans un gel de bohemite (Depagne *et al.,* 2010)

C. Stratégies développées pour préserver les cellules encapsulées

Le succès de la bioencapsulation réside dans le maintien de l'activité biologique qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'environnement lui même (température, pH, composition du milieu, force ionique...). Les bactéries sont particulièrement sensibles aux molécules d'alcool et leur survie peut être compromise pour certains pH et températures. Mis à part le cas des microorganismes vivants dans des milieux salins, une force ionique trop importante peut conduire à un stress osmotique et par conséquent à une lyse cellulaire. Le procédé d'immobilisation par voie sol-gel nécessite donc de pouvoir préserver la viabilité des cellules sur le long terme dans un matériau biocompatible.

L'encapsulation des cellules vivantes présente un véritable challenge comparé à l'immobilisation des enzymes et des protéines (Harper *et al.,* 2010). En effet, les exigences de la matrice pour l'encapsulation sont plus strictes et doivent apporter une interface fonctionnelle entre l'espèce biologique et son environnement (réseau de silice). Les cellules doivent être protégées du stress chimique et mécanique lié au gel qui doit également permettre la diffusion de l'oxygène, des nutriments et des molécules cibles d'intérêt. Les déchets du métabolisme cellulaire doivent aussi pouvoir être expulsés (Murua *et al.,* 2008). Afin de limiter le stress et la lyse des cellules causés par la présence de solvants, de sous-produits, des groupements silanols et de la compression du réseau lors des processus d'encapsulation traditionnels, des stratégies ont été développées :

- Une diminution du temps de contact entre les cellules et la solution de précurseurs sol-gel (Pope *et al.,* 1997 ; Chia *et al.,* 2000). Le temps de gélification dans les processus mettant en jeu des précurseurs aqueux peut jouer un rôle important. En effet, une diminution du temps de gel, permet d'éviter un temps de contact trop long avec les groupements chimiques polaires à la surface de la silice (silanols). Toutefois, la gélification ne doit pas être trop rapide pour permettre une bonne dispersion des cellules dans la matrice ainsi qu'une diminution du stress lié à la compaction du gel (synérèse) à un pH neutre.
- L'incorporation de molécules protectrices (gélatine, PVA, glycérol, glycine betaine,…) (Nassif *et al.,* 2003 ; Conroy *et al.,* 2000)
- Le développement d'une hydrolyse de silicates non cytotoxique et la condensation des sous produits (poly(glycéryl)silicate) (Gill & Ballesteros, 1998)
- L'utilisation de précurseurs aqueux tels que les silicates de sodium et la silice colloïdale (Yu *et al.,* 2005 ; Finnie *et al.,* 2000)
- Le dépôt de films minces de silice sur les cellules par exposition à une phase gazeuse d'alcoxydes de silice (Carturan *et al.,* 2004 ; Campostrini *et al.,* 1996)

Afin de préserver les bactéries du stress osmotique sur le long terme, des additifs tels que le glycérol et la glycine bétaine ont été ajoutés dans les suspensions bactériennes *Escherichia coli* avant d'être encapsulées dans les matrices minérales conçues à partir de silicate de sodium (Nassif *et al.,* 2003 ; Perullini *et al.,* 2011). Ces additifs sont d'excellents osmoprotecteurs. Le glycérol s'accumulant autours des membranes empêche le flux d'eau à l'extérieur des cellules et offre une protection physique contre les interactions nuisibles entre la membrane externe des cellules et les groupements silanols (Si-OH) relativement toxiques (Fig. 11). La glycine betaine naturellement produite par les bactéries est quant elle plus efficace que le glycérol et sa protection est effective à des concentrations de 0,4 M en NaCl.

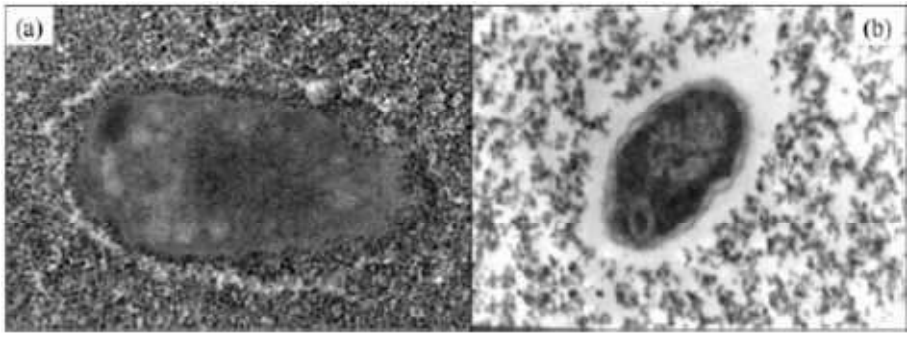


Figure 11 : Bactérie *E.coli* encapsulée dans une matrice de silice agée de (a) 1 mois sans glycérol et (b) 1 jour avec du glycérol (Nassif & Livage, 2011)

Lors des processus d'encapsulation dans les biopolymères, les organismes vivants peuvent se multiplier et le maintien de leur activité biologique est lié au renouvellement de la biomasse. Cependant, pour les matériaux inorganiques, les cellules ne peuvent pas se diviser en raison du confinement du réseau autour de celles-ci. L'immobilisation des organismes sur une longue période dans ce type de matériau nécessite le maintien de leur activité biologique notamment pour la réalisation de capteurs et de réacteurs.

Au cours du vieillissement, le gel évolue et se contracte (synérèse) provoquant une contrainte mécanique sur les cellules. Ainsi l'ajout de glycérol ou de N-(3-triethoxysilylpropyl) gluconamide au cours du procédé sol-gel se sont révélés être d'excellents protecteurs pour les cellules en diminuant le contact entre la membrane cellulaire et le réseau inorganique, conduisant à une meilleure survie des cellules (Ferrer *et al.,* 2006). D'autres stratégies ont été développées pour limiter le contact des cellules avec les précurseurs de silice et la matrice. Des matériaux hybrides ont été conçus en s'inspirant du procédé Biosil en pré-encapsulant des microorganismes dans un bio-polymère (ex : alginate) avant la gélification des matrices inorganiques (Carturan *et al.,* 2004 ; Coradin *et al.,* 2003).

Afin de limiter le stress mécanique, un autre procédé basé sur une technique de congélation-gélification (freeze-gelation) a été développé par Böttcher *et al.* au cours des dernières années (Böttcher *et al.,* 2004 ; Soltmann & Böttcher, 2008). Par le biais de cette technique nommée « biocer » (signifiant biocéramique), une suspension de cellules est mélangée avec un sol de silice, des poudres de céramiques et d'additifs (ex : glycérol, PVA) puis le mélange est congelé à -40 degrés (Fig. 12). La congélation induit alors une gélification de la silice et la formation de glace. Le séchage permet par la suite de retirer l'eau issue des cristaux de glace ce qui conduit à une porosité. Les pores des biocéramiques peuvent être contrôlés au cours du séchage et par l'incorporation d'additifs (ex : sorbitol, polyéthylène glycol) provoquant une séparation de phase au cours de la gélification. Ces matériaux présentent une bonne stabilité mécanique, thermique et photochimique. Dans ces conditions, la contraction du gel reste faible, ce qui limite le stress mécanique.

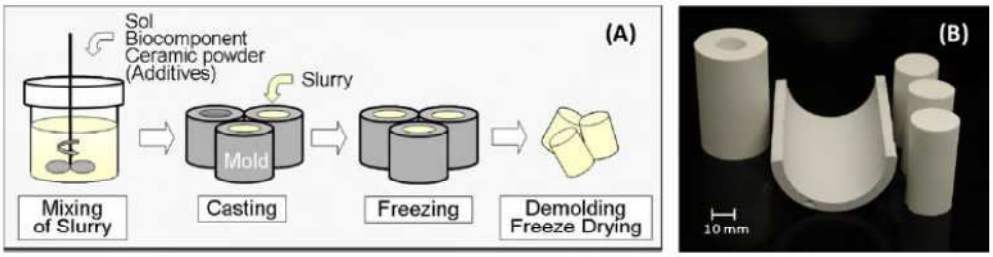


Figure 12 : (A) Méthode de préparation du biocer par la technique de « freeze-gelation » et (B) céramiques obtenues par le procédé biocer (Pannier *et al.,* 2010)

Un nouveau procédé très prometteur par « assemblage dirigé par les cellules » a été élaboré par l'équipe de C. J. Brinker (Baca *et al.,* 2006). Des précurseurs de silice sont mélangés avec des phospholipides et des cellules. Au cours du processus d'encapsulation, se forme une interface lipidique entre les cellules (*E.coli, S. cerevisiae, B. subtilis*) et le réseau de silice. La préservation des microorganismes est alors améliorée grâce à cette interface lipidique piégeant ainsi l'eau à l'intérieur des vésicules et permettant la diffusion des molécules tout en assurant une protection contre l'assèchement notamment lors de la fabrication de films minces (Harper *et al.,* 2010).

D. Les applications

L'encapsulation cellulaire par procédé sol-gel s'est largement développée et présente de nombreuses applications dans l'élaboration de biocapteurs, bioréacteurs, bio-électrodes et dispositifs thérapeutiques. Plus récemment, les études se sont focalisées dans les domaines de la bioremédiation et de l'ingénierie tissulaire.

Les bioréacteurs utilisant des cellules immobilisées dans des matrices se sont révélés très intéressants car ils permettent une séparation des microorganismes et des molécules produites. Ainsi en 1998, des molécules d'intérêt pharmaceutique (alcaloïdes) ont pu être produites par des cellules de plante *Catharanthus roseus* encapsulées dans de la silice (Carturan *et al.,* 1998). Par la suite, l'immobilisation de bactéries *Serratia marcescences* a permis la production de prodigiosine (Nassif *et al.,* 2004). Très récemment, la fabrication de bioélectrode a pu être réalisée par encapsulation de bactéries *E.coli* dans un gel de silice formé dans les pores d'un feutre de graphite (Ouay *et al.,* 2013). La transparence des gels de silice leur confère des propriétés optiques très intéressantes pour l'élaboration de biocapteurs. De ce fait, des bactéries *E.coli* recombinantes luminescentes ont été encapsulées dans des films de silice (Premkumar *et al.,* 2001). En réponse au stress, les bactéries émettaient des photons directement quantifiables par un lecteur (luminomètre). Les micro-algues sont particulièrement intéressantes dans l'élaboration de biocapteurs pour la quantification de la simazine, un herbicide (Pena-Vazquez *et al.,* 2009). Celles-ci ont alors été piégées dans une membrane de silice transparente, puis après une mise en contact avec la simazine, le taux d'inhibition de l'activité photosynthétique a été mesuré. Ainsi plus la concentration en herbicide augmentait, plus le taux d'inhibition de l'activité photosynthétique augmentait.

La bioremediation est un procédé qui consiste en l'utilisation de systèmes biologiques pour éliminer les polluants des milieux contaminés (Kumar *et al.,* 2011). Dans ces conditions, l'exploitation des organismes vivants présente un intérêt car ils permettent de transformer les polluants en composés moins toxiques voire non toxiques. Pour certains traitements (ex : l'air), l'immobilisation des cellules dans un environnement stable permettrait de préserver leur viabilité sur le long terme et le renouvellement de la biomasse par division cellulaire au sein du matériau. Ainsi, plusieurs études ont été dirigées dans l'élaboration de biomatériaux dépolluants combinant des propriétés d'adsorption et de biodégradation. Dans ce sens, la conception de biofiltres présentant une capacité d'adsorption limitée et un taux de dégradation important pourrait permettre une utilisation en continue. D'autre part, il est également possible d'obtenir des matériaux avec une forte capacité d'adsorption et une faible capacité de dégradation. L'encapsulation de cyanobactéries *Nostoc calcicola* a été réalisée dans des gels de silice et dans des billes d'alginate recouvertes de silice (Ramachandran *et al.,* 2009). Ces dernières étaient plus efficaces dans la remédiation des métaux en raison de la forte affinité des alginates pour les métaux et de la bonne stabilité chimique et mécanique de la silice. D'autres organismes tels que *Burkholderia sp* ont été immobilisés dans des gels de silice pour la décontamination des eaux et des sols par conversion des ions toxiques Cr(VI) hautement réactifs en Cr (III) moins toxiques (Fig. 13) (Alvarez *et al.,* 2011).



Figure 13 : Bactéries Burkholderia immobilisées dans des billes de silice avant (à gauche) et après (à droite) réduction du Cr (VI) (Alvarez *et al.*, 2011)

La biotransformation des ions Au (III) en nanoparticules d'or par des microalgues constitue une autre alternative d'extraction d'or en utilisant des espèces biologiques capables de minéraliser des espèces toxiques en particules moins toxiques (Fig. 14) (Sicard *et al.,* 2010). De plus, cette méthode présente un autre intérêt dans la conception de bioréacteur pour la synthèse de nanoparticules par voie biocontrôlée (Dahoumane *et al.,* 2012). Par le biais des processus de biotransformation et de biominéralisation, les microorganismes (bactéries, microalgues, cyanobactéries) constituent de véritables outils de dépollution (métaux, pesticides) (Klaus-Joerger *et al.,* 2001).

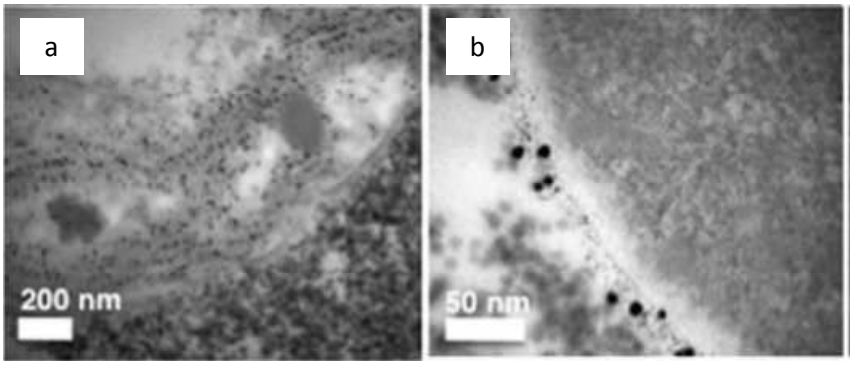


Figure 14 : Images MET d'algues vertes *Klebsormidium flaccidum* immobilisées dans une matrice de silice (a) avec des nanoparticules d'or dans les thylakoides des cellules et (b) dans les exopolysaccharides des cellules (Sicard *et al.*, 2010)

L'élaboration d'hydrogels hybrides à base de collagène et de silice dans des perspectives médicales a permis d'améliorer les propriétés mécaniques tout en favorisant la prolifération des fibroblastes humains (Desimone *et al.,* 2010). Les applications sont notamment ciblées dans le traitement des ulcères chroniques où la prolifération des fibroblastes dans une matrice biocompatible permettrait une stimulation de la guérison (Jones *et al.,* 2002 ; Wong *et al.,* 2007).

III. Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4)

A. La magnétite (Fe_3O_4)

La magnétite (Fe_3O_4) est un oxyde de fer noir et un minéral important responsable des propriétés magnétiques des roches. Dans l'environnement, elle est également minéralisée par une grande variété d'organismes vivants (bactéries magnétotactiques, oiseaux, ...). La magnétite connue sous l'ancien nom de "pierre d'aimant" a été découverte pour la première fois lors de l'Antiquité d'abord en Chine puis en Grèce. Cette pierre noire intriguait par sa capacité à attirer les matériaux à base de fer. La pierre d'aimant est à l'origine du nom "magnétisme". Depuis sa découverte, cet oxyde de fer a suscité beaucoup de questions et est à l'origine des premiers "outils directifs", ancêtres de la boussole fabriqués en Chine à partir d'une pierre d'aimant naturelle sculptée en forme de cuillère. Les détails de la structure de la magnétite ont été établis en 1915 (Bragg W. H., 1915 ; Nishikawa S., 1915). Elle fut l'un des premiers minéraux dont la structure cristallographique a été déterminée par diffraction des rayons X. La magnétite contient à la fois des ions fer II et fer III, ce qui la différencie des autres oxydes de fer. Ce minéral possède des propriétés ferrimagnétiques très intéressantes. Jusqu'à ce jour, la magnétite a fait l'objet de nombreuses études vers une multitude de disciplines et depuis l'essor des nanotechnologies, elle suscite un grand intérêt pour des applications à l'échelle nanométrique (Fig. 15).

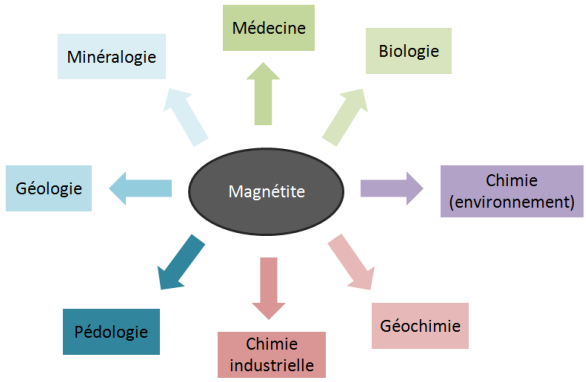


Figure 15 : Différents axes de recherche sur la magnétite

B. Caractéristique structurale et morphologie des nanoparticules de magnétite

La structure cristalline de la magnétite (Fe_3O_4) est cubique du groupe d'espace Fd3m. Contrairement à la maghémite (γ-Fe_2O_3) qui contient seulement des ions Fe^{3+}, la magnétite de structure spinelle est constituée d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} et possède une formule générale AB2X4 où A et B

sont associés aux cations et X aux anions. Le réseau d'empilement de type cubique à faces centrées (cfc), composé de trente deux atomes d'oxygène par maille, se délimite par des sites octaédriques et tétraédriques au sein desquels les cations sont insérés. Les sites tétraédriques sont occupés par un ion Fe^{3+} alors que les sites octaédriques possèdent à la fois les ions Fe^{3+} et Fe^{2+} (Fig. 16).

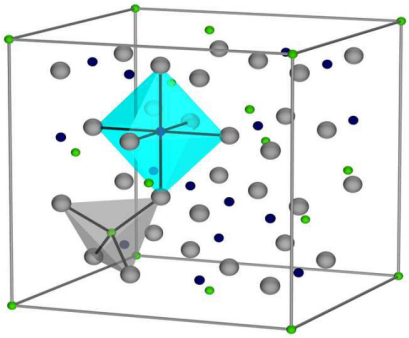


Figure 16 : Structure cristalline de la magnétite (source wikipedia)

Deux sous-réseaux magnétiques sont formés respectivement par les sites tétraédriques (A) et octaédriques (B). La formule structurale de la magnétite est $[Fe^{3+}]A\ [Fe^{3+}, Fe^{2+}]B\ O^{2-}_4$. Les cristaux de magnétite peuvent adopter plusieurs morphologies comme par exemple octaédrique ou rhombo-dodécaédrique (Cornell & Schwertmann, 2003). La forme des cristaux varie en fonction du procédé de synthèse comme nous pouvons le constater dans la figure 17.

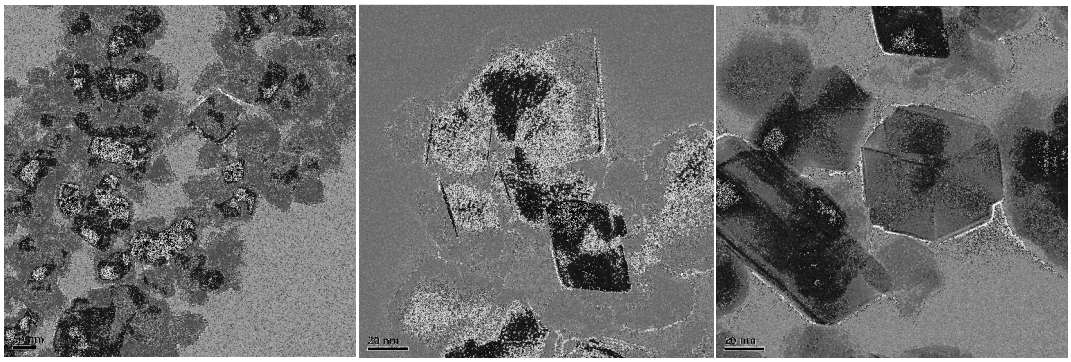


Figure 17 : Nanoparticules de magnétite de formes diverses obtenues par thermohydrolyse

C. Propriétés magnétiques de la magnétite

La magnétite possède 5 électrons célibataires pour les ions Fe^{3+} et 4 électrons non appariés pour les ions Fe^{2+}, ce qui confère un moment magnétique de 5 μ_B pour les ions Fe^{3+} et de 4 μ_B pour les ions Fe^{2+} (le moment magnétique est exprimé en magnéton de Bohr (μ_B)) (Cornell & Schwertmann, 2003).

En dessous de la température de Curie (580°C), la magnétite est ferrimagnétique. L'ordre ferrimagnétique se caractérise ici par un alignement antiparallèle des spins entre les sites

tétraédriques A et octaédriques B (Moskowitz B. M., 1991). Les moments magnétiques des sites A et B ne sont pas égaux, ce qui conduit à un moment magnétique net. Dans le cas de la magnétite, il existe des interactions d'échange des ions fer entre les deux sites AA, BB et AB. Entre les sites AA et BB, les moments magnétiques sont orientés de manière parallèle tandis qu'ils sont dirigés de manière antiparallèle entre les sites AB conduisant ainsi à un moment magnétique net dû aux ions Fe^{2+} du site B (Fig. 18). En effet, les moments magnétiques des ions Fe^{3+} contenus dans les sites tétraédriques et octaédriques s'annulent. La magnétite possède alors une aimantation permanente liée aux ions Fe^{2+} présents dans les sites octaédriques.

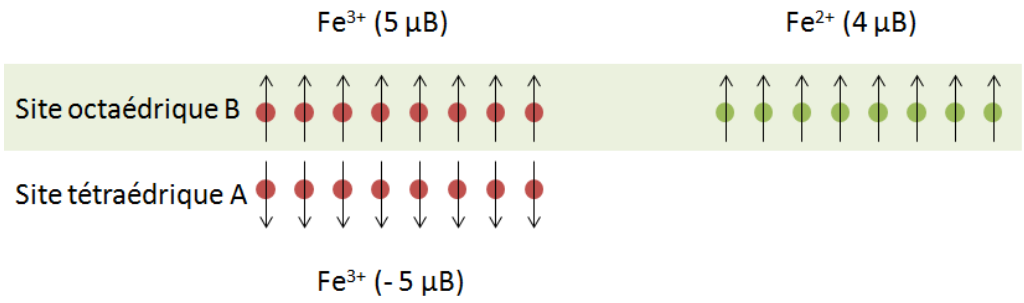


Figure 18 : Comportement ferrimagnétique

Le moment magnétique pour une maille est de 32 μ_B en théorie (Cornell & Schwertmann, 2003). L'aimantation à saturation de la magnétite à l'état massif est de 92 emu/g tandis que celle de la maghémite est de 70 emu/g (Schabes M.E., 1991). Des notions plus générales sur le magnétisme sont présentées dans l'annexe 14.

1. Transition de Verwey

La magnétite possède une caractéristique qui la distingue des autres oxydes de fer. Elle présente une transition de phase à 120 K nommée « transition de Verwey » qui depuis sa découverte il y a plus de 60 ans suscite un grand intérêt (Verwey E. J. W., 1939 ; Walz F., 2002).

La magnétite est un semi-conducteur ferrimagnétique au dessus de la température de Verwey (Tv) (Jackson *et al.,* 2011). Les sauts d'électrons entre les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} du site octaédrique et l'aimantation spontanée produite grâce au couplage des sites AB génèrent une conductivité électrique. Lorsque la magnétite est refroidie en dessous de la température de Verwey (120 K), il se produit une diminution de la conductivité électrique en raison de l'arrêt des sauts d'électrons (Verwey E. J. W., 1939). Le changement cristallographique de cubique (T> Tv) à monoclinique (T < Tv) conduit à une augmentation de l'anisotropie magnétocristalline. Au dessus de la température de

Verwey, l'aimantation est orientée dans l'axe [111] de facile aimantation et l'anisotropie magnétocristalline est minimale pour des cristaux de diamètres égaux (cubiques ou sphériques).

La transition de Verwey est sensible à l'état d'oxydation de la magnétite et une déviation de la stœchiométrie peut entraîner une disparition de cette transition. C'est pourquoi celle-ci n'est pas observée pour la maghémite (cristal obtenu par oxydation de la magnétite) (Özdemir *et al.,* 1993 ; Mi *et al.,* 2009). L'effet de taille joue donc un rôle important car plus les dimensions des particules diminuent plus elles sont sensibles à l'oxydation, ce qui peut donc entraîner la disparition de transition de phase à 120 K.

D. Applications

Les nanoparticules de magnétite présentent un grand intérêt dans les domaines de la biologie et de la médecine : hyperthermie, IRM, libération de gènes ou de médicaments, immunologie, bioséparation (Faraji *et al.,* 2010). Elles sont également au cœur de nombreuses applications dans la fabrication d'appareils de stockage de l'information, de ferrofluides, de catalyseurs, de senseurs chimiques et de pigments. Pour diverses applications, les nanoparticules peuvent être soit utilisées telles quelles et stabilisées par des ligands chimiques apportant une fonction spécifique, soit assemblées pour former un matériau nanostructuré. Les propriétés magnétiques des nanoparticules dépendent notamment des interactions dipolaires conduisant à un effet collectif. Ainsi, selon les propriétés recherchées, les nanoparticules de magnétite peuvent être assemblées en réseau sous forme de couche mince ou bien être utilisées de manière isolée.

E. Synthèses des nanoparticules de magnétite

Il existe plusieurs méthodes de synthèse de nanoparticules à base d'oxydes métalliques. Parmi les plus couramment utilisées en milieu liquide, on retrouve la coprécipitation, la voie hydrothermale, la microémulsion, la synthèse en milieu polyol, la décomposition thermique, la voie sol-gel, la thermolyse et la synthèse par micro-onde. Parmi toutes ces méthodes, nous décrirons seulement la voie polyol et la thermo-hydrolyse qui nous ont permis d'obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer pour la conception de matrices magnétiques.

1. Procédé polyol

La synthèse en milieu polyol consiste à dissoudre un sel métallique (chlorure, nitrate, sulfate, acétate,...) dans un liquide polyol chauffé jusqu'à température d'ébullition (Fiévet & Brayner, 2013). La dissolution des précurseurs solides conduit soit à la formation de particules métalliques par réduction des ions métalliques par le polyol, soit des oxydes ou des hydroxydes métalliques sont obtenus par des réactions d'hydrolyse et de polymérisation. Grâce à l'hydrolyse forcée et à la condensation, une grande variété d'oxydes métalliques peuvent être obtenus tels que les oxydes à base de zinc, cobalt, nickel, fer, titane, qui présentent de grands intérêts dans la microélectronique, le domaine biomédical et dans les processus de photocatalyse (Brayner *et al.,* 2010 ; Wang *et al.,* 2009 ; Poul *et al.,* 2003 ; Chkoundali *et al.,* 2004 ; Basti *et al.,* 2010). Dans la méthode polyol, le taux d'hydrolyse est un paramètre important pour la synthèse des NPs d'oxydes métalliques. Il se définit par : $h = n_{eau} / n_{métal}$ (en moles). L'absence d'eau dans le milieu réactionnel conduit à la formation de particules métalliques. Les synthèses en milieu polyol présentent un grand intérêt car elles permettent d'obtenir des particules de taille et de forme bien contrôlées. Les milieux polyols empêchent l'agglomération des particules par coordination en surface (stabilisation stérique au cours de la croissance des particules) (Fiévet & Brayner, 2013) (Viau *et al.,* 1996). Le procédé polyol permet de contrôler les cinétiques de précipitation et les nanoparticules présentent une distribution de taille restreinte (monodispersité) (Fiévet F., 2000). La synthèse par voie polyol de par sa simplicité, permet de préparer une grande variété de matériaux fonctionnels à l'échelle nanométrique (Fiévet & Brayner, 2013).

a) *Les liquides polyols*

Parmi les liquides polyols les plus couramment utilisés, on retrouve les α diol tels que l'éthylène glycol (EG) et le propylène glycol (PEG) ainsi que les éthers diol tels que le diéthylène glycol (DEG), triéthylène glycol (TREG) et tétraéthylène glycol (TEG).

Les polyols possèdent plusieurs caractéristiques très intéressantes pour les synthèses de nanoparticules à base d'oxydes métalliques. En effet, grâce à leurs liaisons hydrogènes et leur forte permittivité relative, ils peuvent dissoudre de nombreux composés inorganiques. Ils peuvent servir également d'agents réducteurs en réduisant les ions à l'état zéro valent en particulier pour les métaux nobles (argent, or,…) ainsi que certains métaux de transition tels que le cuivre, cobalt et nickel. Pour les ions ferreux, ils permettent d'éviter l'oxydation compétitive en Fe (III). La réduction du Fe II ou Fe III ne peut pas se réaliser en milieu polyol en raison du caractère électropositif du fer

(Viau *et al.,* 1996). Les milieux polyols permettent la nucléation et la croissance des nanoparticules et peuvent servir d'agents complexant pour les cations métalliques dans certains cas (ex : formation de groupes alkoxy) (Poul *et al.,* 1998 : 2000 : 2002 : 2003). Ils peuvent ainsi former des espèces intermédiaires réactives et s'adsorbent à la surface des particules en croissance tout en évitant l'agrégation. Grâce au polyol, les étapes de nucléation et croissance restent séparées favorisant ainsi la formation de nanoparticules monodisperses.

b) *Les mécanismes réactionnels*

Le procédé de synthèse s'effectue en trois étapes selon le diagramme LaMer (Fig. 19) :

- **Etape I** : Prénucléation

Au cours de l'étape de prénucléation, le polyol va dissoudre progressivement le précurseur solide libérant ainsi les espèces métalliques. La concentration en ions métalliques augmente et s'élève au dessus de la concentration à saturation jusqu'à une concentration critique, dite concentration de nucléation, au-delà de laquelle se produit la nucléation (Fiévet *et al.,* 1989).

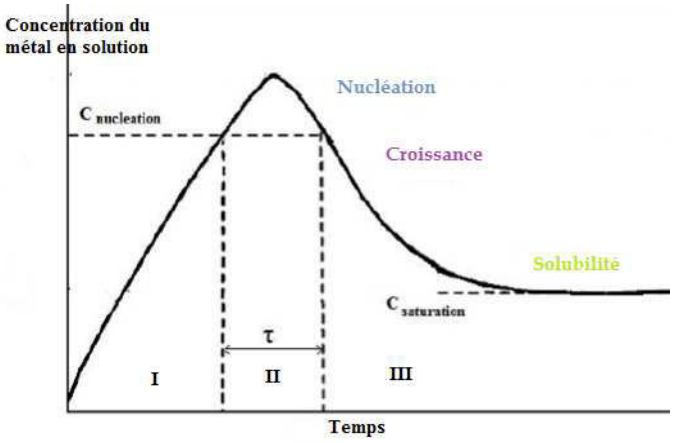


Figure 19 : Diagramme de LaMer

Lorsque la concentration de nucléation est atteinte, il va alors se produire une hydrolyse forcée et une condensation. En d'autres termes, l'hydrolyse se définit comme la neutralisation du cation métallique par des molécules d'eau. Lorsque la charge du cation métallique est inférieure à 4 comme dans le cas du fer, l'hydrolyse peut se produire seulement par chauffage de la solution. Elle va ainsi conduire à la création de précurseurs de charges nulles tels que les $[Fe(OH)_2\,(H_2O)_4]^\circ$ ou $[Fe(OH)_3\,(H_2O)_3]^\circ$ (Jolivet *et al.,* 1994).

- **Etape II :** Nucléation

Durant cette étape, les précurseurs de charges nulles vont condenser spontanément et vont former des germes durant une courte période τ (Faraji *et al.,* 2010). Au cours de la condensation via les processus d'olation et d'oxolation, il se produit les étapes suivantes :

$$M\text{-}OH + M\text{-}OH = M\text{-}OH\text{-}M\text{-}OH = M\text{-}O\text{-}M + H_2O$$

Lorsque la concentration de nucléation est atteinte, la vitesse de condensation augmente et des entités polynucléaires ou germes sont générés de manière « explosive » pendant une courte période τ (Faraji *et al.,* 2010). Le taux de nucléation doit être suffisamment court afin d'éviter que la concentration en cations métalliques ne continue à augmenter.

- **Etape III** : Croissance

Les germes formés lors de l'étape de nucléation vont ensuite grossir rapidement provoquant ainsi une diminution des ions en dessous de la concentration de nucléation (Fiévet *et al.,* 1989). Lors de la croissance, les espèces métalliques vont diffuser vers la surface des particules et s'ajouter petit à petit (Fiévet & Brayner, 2013). Les précurseurs de charge nulle vont condenser préférentiellement sur les germes selon le même processus de condensation se produisant initialement lors de l'étape de nucléation. La croissance des particules s'effectue sur une durée plus courte que la période de nucléation. Lorsque la concentration en précurseur atteint la concentration de saturation (concentration de solubilité), la croissance des particules s'arrête (Jolivet *et al.,* 1994). Durant l'étape de croissance en milieu polyol, la distribution de taille et la morphologie des particules sont bien contrôlées et définies (Faraji et *al.,* 2010). La séparation des étapes de nucléation et croissance selon le diagramme LaMer est un paramètre important pour obtenir des nanoparticules avec des caractéristiques bien définies. Dans certaines situations, la croissance peut également se faire par coalescence des particules primaires qui vont alors donner des particules secondaires plus grosses (Fiévet & Brayner, 2013).

c) *Contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules dans le polyol*

La synthèse en liquide polyol permet d'obtenir des nanoparticules de formes homogènes souvent sphériques avec une distribution de taille restreinte et une limitation de l'agrégation des particules (Fievet F., 2000) (Fiévet & Brayner, 2013). Plusieurs paramètres peuvent moduler la taille et la forme des particules synthétisées par voie polyol (Tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres modulant la taille et la forme des particules synthétisées par voie polyol

Paramètres modulant la taille	Paramètres modulant la morphologie	Paramètres modulant les caractéristiques générales
•Taux d'hydrolyse (action sur la température de reflux) •Température de la réaction •Durée de la réaction pour une température donnée •Augmentation du ratio composé initial/ polyol	•Réactifs (nature et concentration du précurseur solide, nature du polyol, pH de la solution) •Manière dont ces réactifs sont ajoutés (injection) •Conditions de chauffage (taux de rampe de la température, température finale) •Durée de la réaction	•Type de polyol •Nature des sels ferreux •Concentration en ions ferreux •Quantité d'eau (taux d'hydrolyse) •Température de la réaction

2. Synthèse par thermolyse ou thermo-hydrolyse

D'une manière générale, la synthèse par thermolyse consiste à ajouter un précurseur et un surfactant dans un solvant chauffé à haute température. Les ligands vont se lier à la surface des NPs et vont ainsi limiter leur croissance tout en évitant les interactions stériques interparticules et donc l'agglomération (Lu & Yin, 2012). Les avantages de cette méthode résident dans le contrôle de l'étape de nucléation et croissance, ce qui reste plus difficile avec la méthode de co-précipitation conventionnelle. La synthèse par thermolyse permet également d'avoir une distribution de taille restreinte.

a) *Les précurseurs alcoxydes métalliques*

Depuis plus de 100 ans, la chimie des alcoxydes métalliques présente un grand intérêt pour leurs applications en tant que précurseurs dans la synthèse de matériaux technologiques à base d'oxydes (Turova *et al.,* 2002). Les alcoxydes métalliques ont notamment fait l'objet de nombreuses études dans les procédés sol-gel. Au niveau structural, les alcoxydes sont constitués d'un ligand organique lié à un cation métallique leur conférant ainsi une liaison caractéristique : métal-oxygène-carbone (M-OR) (Brinker & Scherrer, 1990).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux alcoxydes de fer et en particulier les glycérolates de fer. Ces derniers composés sont particulièrement intéressants car ils ne s'oxydent pas ou très peu sous air ce qui leur confèrent une stabilité chimique contrairement aux sels métalliques (chlorure, sulfate, acétate de fer (II),...) et aux autres alcoxydes de fer qui doivent donc être

manipulés sous argon. La poudre de couleur verte caractéristique des glycérolates de fer se compose de particules de taille micrométrique en forme de plaquettes dont la structure est organisée en couches octaédriques d'atomes de fer (II) et (III) hexacoordonnés à des atomes d'oxygène. C'est donc entre ces différentes couches que vont s'insérer les chaînes de glycérol (Fuls *et al.,* 1970). Les glycérolates de fer de formule chimique théorique $[C_3H_5O_3)_4\ Fe^{2+}{}_3\ Fe^{3+}{}_2]$ présentent une raie de diffraction importante à 12,6° (2θ) (Rodrique *et al.,* 1978). La stœchiométrie de ces composés peut varier en fonction des sels métalliques utilisés comme précurseurs. L'insolubilité de ces alcoxydes de fer dans les solvants organiques et dans l'eau suggère qu'ils se présentent sous une forme polymérique (Mendelovici *et al.,* 1986). Ces composés peuvent être hydrolysés uniquement par chauffage ou bien décomposés par pyrolyse et peuvent ainsi conduire à la formation de nanoparticules d'oxyde de fer tels que la magnétite ou bien même de l'hématite en fonction des conditions expérimentales.

b) *Procédé de synthèse des nanoparticules de magnétite à partir d'un alcoxyde de fer*

Dans le cadre de notre étude, le procédé de synthèse se déroule en deux étapes :

- Synthèse de l'alcoxyde métallique (précurseur)

- Synthèse des nanoparticules d'oxyde métallique par thermo-hydrolyse d'un alcoxyde métallique

Mécanisme de la réaction de synthèse du glycérolate de fer

Le glycérolate de fer peut être obtenu à partir d'un sel métallique (acétate de fer par exemple) en présence d'eau et de glycérol. Au cours de la réaction, l'acétate de fer va se dissoudre lors du chauffage et la concentration en ions métalliques va augmenter progressivement. Des précurseurs de charges nulles (M-OH) vont être générés par hydrolyse forcée et vont se lier au glycérol selon la réaction suivante :

$$M – OH + OH – R \rightarrow M\ (OR)_n + H_2O$$

M : cation métallique et R : chaîne carbonée du glycérol

Lors de la synthèse, le glycérol va se lier aux monomères (M-OH) par l'intermédiaire du groupement OH conduisant ensuite à la formation de molécules d'eau et du glycérolate de fer (Bruylants *et al.,* 1980).

Mécanisme de la réaction de synthèse de la magnétite

La synthèse de la magnétite s'effectue par thermo-hydrolyse selon 3 étapes :

- **Prénucléation** : L'hydrolyse de l'alcoxyde de fer conduit à la formation de précurseurs de charges nulles selon la réaction suivante :

$$M(OR)_n + H_2O \text{ ---> } M\text{-}OH + ROH \quad (1)$$

Les groupements OR de l'alcoxyde de fer vont être substitués par des groupes hydroxyles OH conduisant à la formation d'un monomère M-OH et d'alcool ROH (Brinker & Scherrer, 1990).

- **Nucléation** : Au cours de la condensation, il se déroule les réactions suivantes :

$$M(OR)_n + OH\text{-}M \text{ ---> } M\text{-}O\text{-}M + ROH \quad (2) \text{ condensation alcoolique}$$

$$M\text{-}OH + OH\text{-}M \text{ ---> } M\text{-}O\text{-}M + H_2O \quad (3) \text{ condensation (eau)}$$

La condensation des précurseurs de charges nulles va conduire à la formation de germes (M-O-M) et de sous-produits comme des molécules d'eau et d'alcool (Brinker & Scherrer, 1990).

- **Croissance :** Les nanoparticules de magnétite vont grossir progressivement par condensation des précurseurs sur les germes préalablement formés.

IV. Effet du champ magnétique sur les organismes vivants

Dans notre environnement, le champ magnétique terrestre s'avère être essentiel pour la préservation de la vie sur Terre et joue un rôle important dans le guidage de certains êtres vivants possédant un système de perception de ce champ (Walcott *et al.,* 1979). En raison des avancées technologiques croissantes, les être vivants sont davantage exposés aux champs magnétiques d'origine anthropique comme ceux utilisés pour le diagnostic en Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM), pour des études scientifiques telles que la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), pour de nouveaux systèmes de transports (trains en lévitation magnétique) ainsi que dans les appareils électriques utilisés dans notre vie quotidienne (WHO, 2006). La présence de ces champs magnétiques environnants a donc suscité beaucoup d'interrogations sur leurs effets potentiels sur les systèmes biologiques et la santé. Jusqu'à ce jour des études ont été menées pour déterminer l'influence des différents champs magnétiques (pulsé, statique, très faible

fréquence,…) sur les organismes vivants (microorganismes, cellules eucaryotes, animaux). Toutefois, les résultats se montrent parfois contradictoires. En effet, l'influence des champs magnétiques dépend notamment de leur intensité, du type de champ, du type de cellules et des conditions expérimentales (temps d'exposition, température,…). Il est donc très difficile de comprendre réellement leurs effets induits sur les cellules en raison du manque de ligne directrice qui permettrait de répertorier les effets dans des conditions contrôlées sur un organisme spécifique. Nous verrons dans un premier temps les effets des champs magnétiques sur les systèmes biologiques puis dans un second temps leurs impacts potentiels sur la magnéto-perception et sur les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques.

A. Les effets sur les systèmes biologiques

Les différents types de champs magnétiques (statiques, alternatifs ou pulsés) peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur intensité (Filipic *et al.,* 2012). Un champ magnétique est considéré comme étant faible lorsque celui-ci est inférieur à 1 mT. Il est modéré entre 1mT et 1 T, fort entre 1 et 5 T et ultra fort lorsqu'il est supérieur à 5 T. Ainsi, les effets sur les systèmes biologiques dépendent à la fois de l'intensité de ce champ et du type de champ (statique, alternatif ou pulsé). L'introduction massive de nouveaux champs d'origine anthropique a suscité de nombreuses questions sur leurs effets potentiels au niveau de la santé. Jusqu'à ce jour beaucoup d'études ont été menées à ce sujet. Nous décrirons par la suite certains phénomènes observés sur les systèmes biologiques.

1. Effets sur les cellules eucaryotes

Etant donné que notre étude se base sur les champs magnétiques statiques, une attention particulière sera donc portée à ce type de champ. Ce domaine de recherche a fait l'objet de nombreuses études portant sur l'impact au niveau cellulaire et notamment sur les espèces et les enzymes impliquées dans le stress oxydatif, sur l'ADN, la prolifération cellulaire, la morphologie et l'orientation des cellules.

Les effets du champ magnétique statique dépendent des tissus ciblés, des caractéristiques de l'aimant et de la posologie (Colbert *et al.,* 2009). Comme les champs magnétiques statiques sont difficiles à atténuer, ils peuvent librement pénétrer dans les tissus biologiques (Hashish *et al.,* 2008). Les particularités de ces champs résident dans leur capacité à interagir directement avec les charges en mouvement telles que les ions et les protéines contenant un ion métallique et ils peuvent

intervenir par le biais de processus physiques sur les matériaux magnétiques présents dans les tissus (WHO, 1987).

Afin de déceler les éventuels impacts au niveau cellulaire, des études se sont portées sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et sur le stress oxydatif induit. Les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans le système immunitaire (Nathan C., 1992), la transduction des signaux intracellulaires et la régulation de l'expression des gènes (Halliwell B., 2001; Halliwell & Gutteridge, 1999). Une modulation de leur production peut donc affecter directement les systèmes biologiques et conduire à un stress oxydatif si ces espèces sont en concentration élevée et que le système de protection des cellules est dépassé. Parmi les ERO, on retrouve les anions superoxydes, les radicaux hydroxyl, l'oxygène singulet, le péroxyde d'hydrogène et les espèces réactives de l'azote telles que l'oxyde nitrique (NO). Plusieurs études ont laissé entrevoir qu'un champ magnétique statique pourrait influencer la production de ces espèces conduisant soit à une augmentation soit à une réduction (Okano H., 2008 ; Kula *et al.,* 2000 ; Zmyslony *et al.,* 1998). Cependant, les études sont souvent contradictoires car tandis que certaines démontrent un stress oxydatif induit, d'autres suggèrent que des modifications biochimiques indiqueraient une adaptation au léger stress oxydatif causé par un champ électromagnétique (Amara *et al.,* 2009 ; Chater *et al.,* 2006). Ce désaccord peut notamment s'expliquer par l'intensité du champ et la durée d'exposition. Parmi les effets constatés, un champ magnétique statique modéré de 128 mT pourrait induire un stress oxydatif dans le cortex frontal et l'hippocampe chez le rat exposé au champ pendant 1h chaque jour durant un mois d'expérimentation (Amara *et al.,* 2009). Cependant, un effet positif marqué par une diminution du stress oxydatif a été démontré chez l'homme exposé pendant une courte durée à un champ de 1,5 T lors d'une IRM (Sirmatel *et al.,* 2007).

D'autres études ont été menées sur les éventuels effets au niveau de l'ADN, des protéines ainsi que sur l'influx du calcium au niveau cellulaire. Les champs magnétiques sembleraient induire des dommages au niveau de l'ADN mais leurs impacts sont controversés (Fiorani *et al.,* 1992). Des effets négatifs ont pu être observés lorsque des lymphocytes étaient incubés en présence de chlorure ferreux et exposés à un champ statique de 7 mT (Zmyslony *et al.,* 2000). A ce jour, il a déjà été démontré que les protéines étaient sensibles aux modulations des champs électriques et magnétiques. L'enzyme Na-K ATPase pourrait s'altérer en présence d'un champ magnétique, ce qui provoquerait des modifications fonctionnelles (comportement différent) (Black *et al.,* 1995). Un champ magnétique induirait des changements au niveau du calcium intracellulaire (Lyle *et al.,* 1997). Toutefois, des études ont montré qu'une modulation de l'influx de calcium pourrait augmenter la survie des cellules en inhibant l'apoptose (Fanelli *et al.,* 1999 ; Teodori *et al.,* 2002[a,b]; Chionna *et al.,* 2003). Une augmentation de l'influx de calcium au sein des lymphocytes humains a pu être constatée

suite à une exposition à un champ magnétique statique de 4,7 T combiné à un champ pulsé de 0,7 mT (Aldinucci *et al.,* 2003).

D'autres questions se sont également posées en ce qui concerne la prolifération, la morphologie et l'orientation des cellules sous l'effet d'un champ magnétique. Il a été montré que pour des champs forts jusqu'à 10 T, ceux-ci n'affectaient pas la croissance ni la prolifération des cellules, ni le modèle de distribution du cycle cellulaire et ni la mort cellulaire apoptotique des cellules CHO-K1 jusqu'à 4 jours d'exposition (Nakahara *et al.,* 2002). De même que des champs de 1,5 T n'avaient aucune incidence sur la prolifération et la morphologie des cellules humaines HeLa après une exposition de 96 h (Sato *et al.,* 1992). Cependant une étude a pu démontrer que l'application d'un champ statique de 0,2 T pendant 1 h modifiait la morphologie des cellules de fibroblastes humains (Pacini *et al.,* 2003). En 1965, Murayama a découvert que les érythrocytes falciformes pouvaient s'orienter perpendiculairement à un champ magnétique de 0,35 T. Par la suite, il a été démontré que les érythrocytes normaux pouvaient orienter leur plan de disque parallèle à la direction du champ magnétique (entre 1 et 4 T) (Higashi *et al.,* 1993). Ce comportement serait dû à l'effet diamagnétique des composants membranaires tels que les protéines transmembranaires et la bicouche lipidique (Higashi *et al.,* 1995). En 1984, Torbet & Ronziere firent la découverte que des macromolécules de collagène pouvaient s'orienter dans un champ statique d'1 T. Par la suite, plusieurs travaux démontrèrent que sous exposition à un champ fort, les fibroblastes humains et les ostéoblastes pouvaient aussi s'orienter (Guido & Tranquillo, 1993 ; Kotani *et al.,* 2000). Quelques années plus tard, Iwasaka *et al.,* 2003 suggéra que les cellules des muscles lisses exposées à un champ de 14 T pendant 60 h pouvaient orienter leur axe longitudinal le long des lignes de champ.

2. Effets sur les cellules procaryotes

L'étude des effets du champ magnétique sur les microorganismes tels que les bactéries (Triampo *et al.,* 2004 ; Uchida *et al.,* 2008 ; Mihoub *et al.,* 2012), levures (Novák *et al.,* 2007 ; Ruiz-Gomez *et al.,* 2004) et parasites (Gul Guven *et al.,* 2006) contribue à améliorer notre compréhension des phénomènes sur des entités biologiques relativement simples à manipuler et permet également de se projeter vers des systèmes appliqués. En effet, l'utilisation des champs magnétiques pour des manipulations biologiques présente un grand intérêt notamment dans la production à faible coût de polyhydroxyalcanoates (PHAs) (bioplastique) par les boues activées (Chen & Li, 2008) et la production de molécules d'intérêt telles que la cellulose (biopolymère) (Park *et al.,* 2012). Dans cette dernière étude, des nanoparticules de magnétite immobilisées à la surface des bactéries *Acetobacter xylinus* ont permis de contrôler la localisation des cellules dans le milieu de culture sous l'application d'un champ magnétique extérieur sans affecter l'activité métabolique. D'autres travaux ont également été

pensés dans une optique de bioséparation des *Pseudomonas delafieldii* immobilisées dans des billes d'alcool polyvinilique magnétiques et des *Rhodococcus erythropolis* enrobées de nanoparticules de magnétite (Shan *et al.,* 2003 ; Li *et al.,* 2009). A ce jour, une autre application appelée « magnéto-transformation » suscite également un grand intérêt. Cette nouvelle technique consiste à transférer à l'intérieur des bactéries des nanoparticules magnétiques contenant un ADN plasmidique grâce à l'exposition à un champ magnétique pulsé (Chen *et al.,* 2006).

Bien que les champs magnétiques puissent présenter de grands intérêts pour les manipulations biologiques de microorganismes, ils sont encore sujets à une multitude de questionnements au niveau de leur impact potentiel sur les cellules. Comme nous avons pu voir précédemment, les études sur l'effet des champs magnétiques sont conflictuelles et nous verrons que sur les microorganismes, les résultats sont tout autant contradictoires. Selon Chow & Tung 2000, une exposition des bactéries *Escherichia coli* à un champ magnétique sinusoïdal à faible fréquence (50 Hz), conduirait à améliorer la réparation de l'ADN grâce à la surproduction des protéines « Heat shock » DnaK/J (Hsp70/40). Plus tard en 2006, Del Re et son équipe démontrent qu'il y a bien une surproduction de protéines DnaK et GroEL en présence d'un champ sinusoïdal de 50 Hz (1 mT) mais que sous l'application d'un champ pulsé, la quantité de ces protéines diminue. Cette étude suggère donc que l'effet est dépendant du type de champ magnétique appliqué. Selon Strazak *et al.,* 2002, le nombre de bactéries *E.coli* diminuait avec le temps d'exposition à un champ à faible fréquence (50 Hz, 10 mT), suggérant ainsi un effet bactéricide. Une diminution du nombre de bactéries *Staphylococcus aureus* a également pu être observée en fonction du temps d'exposition et de la force du champ (Fojt *et al.,* 2004). Toutefois, ces bactéries étaient moins sensibles que les *E.coli*, ce qui montre que les effets sont dépendants du type de souche. Lorsque les bactéries *E.coli* étaient exposées à un champ inhomogène (entre 5 et 6 T), l'expression des gènes *rpoS* était amplifiée et le nombre de cellules en phase stationnaire était beaucoup plus important que celles non exposées (Horiuchi *et al.,* 2001). De plus, un champ magnétique statique de 100 mT ne semblait pas affecter la croissance des *E.coli* (Kohno *et al.,* 2000) alors qu'un champ de 300 mT augmenterait la prolifération des cellules et aurait un effet sur l'expression des gènes (Potenza *et al.,* 2004). La viabilité des bactéries diminuait avec le temps d'exposition à un champ statique de 450 mT en fonction de la température (Ji *et al.,* 2009). Un champ magnétique statique de 17 mT induirait une inhibition de la croissance des *E.coli* et *Pseudomonas putida* qui varierait également avec la température (Filipic *et al.,* 2012). Toutefois, cette inhibition de croissance n'augmentait pas de manière linéaire avec l'intensité du champ. Un champ statique de 17 mT provoquerait une augmentation de l'activité de la deshydrogénase, de l'ATP intracellulaire en réponse au stress bactérien et de l'expression des gènes *rpoS*.

Dans toutes ces études, nous avons pu constater que beaucoup de facteurs abiotiques différaient comme la température, le temps d'exposition, le type de champ, la composition du milieu de culture, l'homogénéité du champ,… Tous ces paramètres montrent une certaine complexité à mener des études comparatives sur les impacts cellulaires des champs magnétiques. Cependant, il existe plusieurs théories concernant les effets relatifs sur les organismes vivants :

- 1 - Les molécules de la membrane cellulaire diamagnétique pourraient entrer en mouvement sous l'effet d'un champ extérieur, ce qui aurait une influence sur les canaux ioniques et sur la mobilité des ions à travers la membrane (Rosen A. D., 1993, 1994, 1996 ; Strasak *et al.,* 2002; Luciana & Luigi, 2005). Ces phénomènes pourraient alors induire des effets sur la viabilité ainsi que sur la structure et l'intégrité membranaire qui affecterait la croissance des cellules (Mansilla *et al.,* 2004).

- 2 - Les complexes ions-protéines pourraient être affectés (Edmonds D. T., 1993 ; Binhi 1997[a,b], 1998, 2000 ; Binhi *et al.,* 2001; Lednev V. V., 1991).

- 3 - Des radicaux libres pourraient être générés et affecteraient les cellules (Okano, H., 2008).

3. Effets sur la magnéto-réception

Depuis la découverte surprenante d'organismes capables de s'orienter spatialement et de naviguer grâce au champ magnétique terrestre, beaucoup d'interrogations se sont posées sur ces mécanismes de magnéto-réception. Comment certains organismes vivants peuvent-ils percevoir un faible champ statique de 50 µT tel que celui de la Terre et qui leur permettrait de se diriger vers des habitats plus propices ? Plusieurs études ont convergé vers deux mécanismes où l'un serait lié à la présence de magnétite biogénique qui agirait comme un capteur sensoriel pouvant jouer le rôle de transducteur du champ magnétique terrestre et un autre mécanisme serait lié à la magnéto-réception chimique par l'intermédiaire des radicaux libres.

Selon le premier mécanisme, le champ magnétique pourrait être détecté par des particules magnétiques avec une rémanence. Le mouvement des cristaux de magnétite permettrait la détection de l'intensité, l'inclinaison ou la polarité du champ magnétique (Kirschvink & Gould, 1981 ; Kirschvink *et al.,* 2001, 2010). La découverte des bactéries magnétotactiques contenant des chaînes de cristaux de magnétite a suscité un grand intérêt pour ce type de matériaux biogéniques (Blakmore R. P., 1975 ; Frankel & Blakmore, 1989)**.** En effet, ces petits aimants alignés en chaîne permettent l'alignement passif des bactéries dans le champ magnétique terrestre. Ce type de mécanisme a conforté l'hypothèse d'un système sensoriel induit par les minéraux biogéniques et constitue un exemple sur

l'effet de la force du champ magnétique sur la biologie (Blakemore R. P., 1975 ; Kalmijn & Blakemore, 1978 ; Blakemore *et al.,* 1980 ; Kirschvink & Gould, 1981 ; Kirschvink *et al.,* 2001). Ces cristaux de magnétite ont été également retrouvés dans les tissus de nombreux animaux et associés à un nerf trijumeau jouant également un rôle dans la magnéto-réception (Wiltschko & Wiltschko, 1995 ; Walker *et al.,* 1997; Diebel *et al.,* 2000; Fleissner *et al.,* 2003, 2007). Il a été montré qu'un champ magnétique pulsé suffisamment fort pouvait modifier la coercivité des minéraux magnétiques qui seraient alors aimantés de nouveau dans la direction du champ pulsé appliqué, ce qui aurait pour conséquence de désorienter les oiseaux (Holland R. A., 2010). Un champ magnétique pulsé affecterait également le système d'autoguidage des chauves-souris, des rats taupes et des tortues de mer (Holland *et al.,* 2008 ; Marhold *et al.,* 1997 ; Irwin & Lohmann, 2005*).* Chez les bactéries magnétotactiques, les cristaux de magnétite monodomaines allongés peuvent seulement être aimantés de manière parallèle à l'axe longitudinal conférant ainsi une polarité (Kalmijn & Blakemore, 1978). Lorsqu'un champ magnétique pulsé est appliqué de manière antiparallèle à la direction de l'aimantation, il se produit une inversion de la direction du moment magnétique conduisant à un changement de comportement des bactéries qui vont nager vers le sud au lieu d'aller vers le nord.

D'autres études sur les animaux ont pu mettre en avant l'existence d'un autre mécanisme sensoriel appelé « magnétoréception chimique » faisant intervenir des radicaux libres. Selon Scaiano *et al.,* 1994, un champ magnétique serait capable de modifier certaines réactions chimiques où les radicaux libres sont impliqués. Ainsi le champ magnétique terrestre peut modifier l'état non apparié des spins électroniques des éléments chimiques photorecepteurs dans l'œil, ce qui les conduirait à osciller entre l'état non apparié singlet et triplet (Schulten *et al.,* 1978; Schulten & Windemuth, 1986 ; Ritz *et al.,* 2000; Wang & Ritz, 2006 ; Rogers & Hore, 2009). La détection du champ magnétique serait donc liée au système visuel (Heyers *et al.,* 2007 ; Zapka *et al.,* 2009). Chez les oiseaux, il existe une région du cerveau nommée « cluster N » et qui agirait comme une boussole lors de la vision nocturne (Mouritsen *et al.,* 2005 ; Zapka *et al.,* 2009). Une protéine cryptochrome (pigment) agirait quant à elle comme un photorécepteur de la lumière bleue (Ritz *et al.,* 2000; Liedvogel *et al.,* 2007; Solov'yov *et al.,* 2007; Solov'yov & Schulten, 2009). Des études ont pu mettre en évidence que les radicaux pairs jouaient un rôle important dans le système de boussole sur les cryptochromes et que les oiseaux étaient désorientés à certaines longueurs d'ondes et intensité de lumière (Muheim *et al.,* 2002 ; Wiltschko & Wiltschko, 2002 ; Wiltschko *et al.,* 2008). Un champ magnétique oscillant perturberait le système des radicaux pairs et la capacité à utiliser le système de boussole pour l'orientation (Canfield *et al.,* 1994 ; Ritz *et al.,* 2004 : 2009).

4. Effets sur les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques

La magnéto-réception des bactéries magnétotactiques est un mécanisme biophysique simple qui pourrait permettre de mieux comprendre les effets du champ magnétique extérieur sur les cellules. L'étude du champ magnétique sur les organismes vivants s'est poursuivie afin de comprendre quels seraient les impacts éventuels sur les bactéries magnétotactiques *Magnetospirillum magneticum* (AMB-1). Des cultures inoculées avec des cellules non magnétiques (sans magnétosomes) et magnétiques (avec magnétosomes) ont alors été exposées pendant leur phase de croissance à un champ pulsé de 1 et 2 mT, un champ sinusoïdal de 1 mT et un champ statique de 200 mT *(*Wang *et al.,* 2009[a] ; Pan *et al.,* 2010 ; Wang *et al.,* 2008[a] ; Wang *et al.,* 2009[b]). Toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions mais en variant seulement l'intensité et le type de champ. Dans toutes les situations, il a été montré que les différents types de champ affectaient la production des magnétosomes. Le nombre moyen de particules magnétiques au sein des bactéries augmentait en présence d'un champ magnétique et les valeurs du coefficient de magnétisme cellulaire (Cmag) étaient également plus importantes. Une augmentation du pourcentage de bactéries contenant des magnétosomes matures (monodomaines) se traduit par une valeur de Cmag plus importante. L'augmentation du nombre moyen de magnétosomes par cellule était notamment très marquée en présence d'un champ statique de 200 mT *(*Wang *et al.,* 2009[b]). Un champ magnétique pulsé de 1 mT conduirait à des modifications au niveau de la morphologie (incohérente) et de l'arrangement des particules dans les cellules. De plus, la précipitation de la magnétite induite par les magnétosomes adjacents serait également affectée (Wang *et al.,* 2009[a]). Les bactéries exposées à un champ pulsé de 2 mT pourraient produire des cristaux de meilleure qualité et il y aurait une stimulation de particules plus larges (Pan *et al.,* 2010). Ce type de champ pourrait induire plus de variations morphologiques dans l'uniformité de la taille du cristal et affecterait la distribution des magnétosomes. L'application d'un champ sinusoïdal de 1 mT, aurait une influence sur la linéarité des chaînes de magnétosomes et des cristaux magnétiques plus petits seraient arrangés moins régulièrement en chaîne (Wang *et al.,* 2008[a]). L'orientation et l'intensité variable du champ magnétique sinusoïdal produirait une conversion du pôle magnétique des particules nouvellement formées, ce qui aurait pour conséquence d'affecter la formation des particules magnétiques et l'arrangement des magnétosomes adjacents. En présence d'un champ magnétique statique de 200 mT, la biominéralisation des magnétosomes serait facilitée et la linéarité de la chaîne des magnétosomes serait affectée. (Wang *et al.,* 2009[b]). L'effet de l'absence d'un champ magnétique terrestre (champ hypomagnétique de 500 nT) sur la biominéralisation a été étudié afin de mieux comprendre l'impact du champ magnétique terrestre sur les bactéries magnétotactiques

AMB-1 (Wang *et al.,* 2008[b]). Cette étude a permis d'analyser la relation entre les organismes vivants et le champ magnétique terrestre. Il a été démontré que les bactéries contenaient plus de magnétosomes monodomaines sous un champ hypomagnétique.

Le processus de biominéralisation par les bactéries magnétotactiques fait intervenir une multitude d'enzymes. En présence d'un champ magnétique, les études ont montré que l'expression de ces enzymes pouvait être modifiée. Des cellules exposées à un champ pulsé de 1 mT sur-régulaient l'expression des gènes des protéines MamA et MagA, ce qui pourrait justifier le nombre plus important de magnétosomes et la présence de chaînes en excès (Wang *et al.,* 2009[a]). En effet, la protéine MagA est impliquée dans l'absorption du fer et la biominéralisation de la magnétite (Nakamura *et al.,* 1995) et MamA quant à elle joue un rôle dans l'assemblage des magnétosomes, la régulation de la longueur des magnétosomes et elle exerce un rôle de récepteur pour l'interaction protéine-protéine dans les magnétosomes (Komeili *et al.,* 2004) (Taoka *et al.,* 2006). Lorsque les bactéries sont exposées à un champ magnétique sinusoïdal de 1 mT, les cultures inoculées avec des cellules non magnétiques sur-régulaient l'expression des gènes *mms6*, *mamA* et *magA* tandis que celles inoculées avec des cellules magnétiques sur-régulaient *mms6*. Mms6 est une protéine qui lie le fer et sa présence dans les réactions de synthèse de la magnétite in vitro conduisait à des particules de taille et de forme similaire à celles produites dans les magnétosomes (Wang *et al.,* 2008[a] ; Arakaki *et al.,* 2003). Elle intervient dans la synthèse de magnétite de taille uniforme et dont la distribution de taille est restreinte avec une morphologie cubo-octaédrique (Amemiya *et al.,* 2007). En absence de Mms6, les cristaux formés étaient de forme octaédrique et plus grands avec une augmentation de la distribution de taille. La surexpression de ces gènes en présence d'un champ magnétique sinusoïdal pourrait donc justifier le nombre plus important et la petite taille des cristaux magnétiques dans les cellules. La diminution de taille des particules au sein des cellules pourrait être due à une sur-régulation de l'expression de *mms6*. De même qu'une sur-régulation de l'expression des gènes *mamA* et *magA* sous l'application d'un champ sinusoïdal pourrait être la raison de l'augmentation du nombre de cristaux magnétiques et de l'augmentation de la valeur de Cmag dans les cultures. L'exposition à un champ magnétique statique sur-régulerait l'expression de *mamA*, *mms13*, *magA* dans les cultures inoculées avec les cellules magnétiques et l'expression de *mms13* (Mms13 est une enzyme impliquée dans la synthèse des magnétosomes) dans les cultures inoculées avec des cellules non magnétiques ce qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre de magnétosomes dans les bactéries (Wang *et al.,* 2009[b]). Ainsi, il se pourrait qu'il y ait une corrélation entre l'augmentation des valeurs de Cmag, le nombre de particules magnétiques et les variations d'expression de *mms13* qui était sur-régulée en présence d'un champ magnétique statique.

Il a été montré que les différents champs magnétiques appliqués pouvaient affecter la formation des magnétosomes et l'expression des gènes associés dans la production des magnétosomes suggérant que les bactéries ont la capacité de s'adapter aux changements liés à la présence d'un champ magnétique extérieur et qu'elles pourraient ainsi réguler la formation de leurs magnétosomes. Grâce à cette nouvelle approche, il serait alors possible d'augmenter ou d'améliorer la formation des magnétosomes en présence d'un champ magnétique. Ceci pourrait permettre à l'avenir de construire des particules magnétiques fonctionnelles à travers l'ingénierie génétique pour diverses applications en biosciences et biotechnologie.

Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit dans quatre disciplines différentes : chimie, physique, biologie et sciences de la Terre. L'objectif principal consiste en l'étude de l'effet du champ magnétique sur les phénomènes de biominéralisation. Cette thématique n'est encore à ce jour très peu explorée sur les bactéries magnétotactiques. L'encapsulation de ces microorganismes dans des matrices élaborées par voie sol-gel n'avait encore jamais été réalisée. Ces bactéries étant particulièrement sensibles à leur environnement, les premières études ont tout d'abord été réalisées sur des bactéries modèles *Escherichia coli*, très utilisées dans les domaines de la bioencapsulation. L'idée de piéger des bactéries magnétotactiques dans des matrices de silice est liée à plusieurs aspects. Comme nous avons pu voir dans le chapitre bibliographique, dans des conditions de cytocompatibilité, les gels préservent la viabilité et l'activité métabolique des cellules, ce qui permet l'exploitation des systèmes biologiques dans des matériaux fonctionnels protecteurs. Dans leur environnement naturel, les bactéries magnétotactiques sont soumises à un comportement « tactique ». Elles peuvent ainsi s'aligner dans un champ magnétique extérieur, c'est ce que l'on appelle le « magnétotactisme » (Fig. 20). Ces microorganismes peuvent également détecter la présence d'oxygène et se diriger par conséquent en fonction des concentrations en oxygène, ce phénomène s'appelle l' « aérotactisme ».

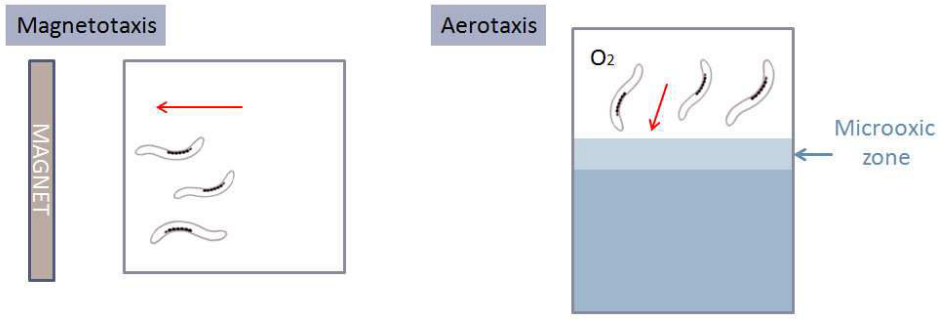


Figure 20 : Comportements des bactéries magnétotactiques

L'encapsulation des bactéries magnétotactiques permet donc d'éviter le déplacement des cellules afin de permettre une exposition homogène à un champ magnétique. La dispersion des cellules dans les gels de silice constitue également un paramètre important dans le sens où celles-ci ne vont pas sédimenter et ne vont pas interagir entre elles par le biais de molécules chimiques appelées « quorum sensing ». Le comportement des cellules isolées peut alors être étudié dans les matrices solides.

Un autre paramètre important réside dans le contrôle de la division cellulaire, impossible à réaliser pour des bactéries en suspension. Ainsi, les bactéries piégées dans la silice ne peuvent pas se diviser en raison des contraintes mécaniques exercées par le réseau inorganique. Grâce à

l'encapsulation, il est alors possible d'étudier des microorganismes à un cycle de leur vie. Dans le cas des bactéries magnétotactiques, le blocage de la division cellulaire permet d'étudier les phénomènes de biominéralisation de manière plus contrôlée. En effet, lorsqu'une bactérie en division possède des magnétosomes, la chaîne va alors se briser et les particules se répartissent alors dans les deux bactéries (Fig. 21). Ainsi en bloquant le cycle cellulaire, les observations et l'interprétation des phénomènes de biominéralisation au sein des gels à un temps précis seront plus faciles.

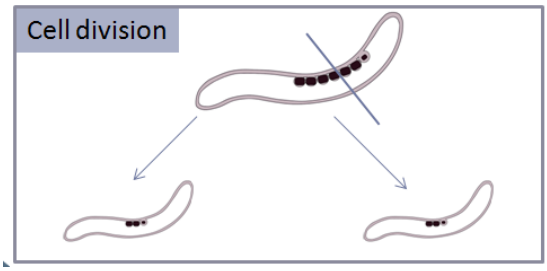


Figure 21 : Bactéries magnétotactiques en cours de division

Dans le cadre de notre étude, nous avons élaboré deux types de matrices (Fig. 22) :

- Une matrice de silice dans laquelle sont incorporées des nanoparticules de magnétite pour la création d'un champ magnétique interne généré par la rémanence du matériau (1).
- Une matrice de silice exposée à un champ magnétique statique externe créé par deux aimants placés de part et d'autre du gel (2).

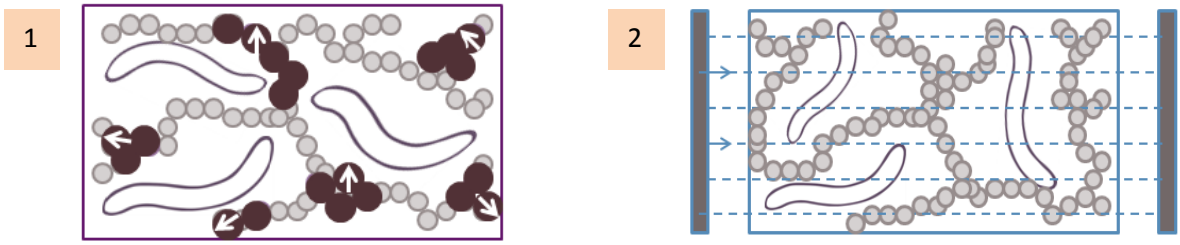


Figure 22 : Gel bactérien à base de silice contenant des nanoparticules de magnétite (1) et gel bactérien à base de silice exposé à un champ magnétique statique externe

Ces deux types de gels permettent ainsi une exposition homogène des bactéries au champ magnétique créé soit par des particules magnétiques soit par des aimants. L'avantage des matrices à base de silice et de magnétite réside dans la manipulation du matériau qui peut être transporté à différents endroits tout en conservant le champ magnétique interne tandis que le dispositif avec les aimants ne peut pas permettre une grande flexibilité dans la manipulation des gels. Toutefois, ces deux approches sont toutes deux très intéressantes car les types de champs appliqués sont différents, ce qui pourrait affecter différemment le comportement des bactéries.

La conception des gels magnétiques nécessite une bonne homogénéité dans la dispersion des nanoparticules de magnétite afin d'exposer les bactéries au champ magnétique de manière homogène et d'avoir des propriétés magnétiques contrôlées.

L'application d'un champ magnétique statique extérieur se réalise par l'intermédiaire de deux aimants séparés à une certaine distance l'un de l'autre. Les aimants permettent de créer des champs magnétiques stables et constants. Il s'agit d'un moyen simple pour exposer les bactéries à un champ magnétique dont l'intensité peut être modulée en fonction de la distance entre les aimants. Les lignes de champ magnétique sont orientées du pôle nord vers le pôle sud magnétique. La région située entre les deux aimants ne présente pas de distorsions dans les lignes magnétiques en raison du parallélisme de celles-ci, ce qui crée un champ homogène.

Les chapitres suivants décriront l'élaboration des protocoles allant de la synthèse des nanoparticules jusqu'à la conception des matrices magnétiques pour la bio-encapsulation. Un suivi de la viabilité des bactéries encapsulées dans des gels de silice avec ou sans nanoparticules de magnétite et dans des matrices de silice exposées à un champ magnétique externe sera réalisé afin de vérifier les conditions de cytocompatibilité. Puis, nous évaluerons les effets du champ magnétique sur les processus de biominéralisation.

Les résultats obtenus pourront par la suite ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine des matériaux magnétiques fonctionnels dans une optique d'utilisation de nano-aimants biogéniques pour des applications biomédicales et pour la réalisation de bioréacteurs ou de biocapteurs cellulaires magnétiques.

Chapitre II – Conception des matrices magnétiques pour l'encapsulation

Chapitre II – Conception des matrices magnétiques pour l'encapsulation 70

I. Synthèse des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) et caractérisations 71

A. Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques par procédé polyol et caractérisations 71

B. Synthèse de microsphères par voie solvothermale et caractérisations 83

C. Synthèse des nanoparticules monodomaines par thermo-hydrolyse et caractérisations 86

D. Bilan 98

II. Elaboration des matrices magnétiques et caractérisations 99

A. Protocoles d'élaboration des gels de silice et des gels magnétiques 99

B. Caractérisations des différents gels 102

C. Bilan 112

Chapitre II – Conception des matrices magnétiques pour l'encapsulation

L'originalité de ce travail de thèse réside dans la conception de gels de silice cytocompatibles pour l'encapsulation des bactéries dans un environnement magnétique. Le terme de cytocompatibilité est attribué à un matériau fonctionnel qui n'exerce aucun effet néfaste sur les cellules. Comme nous avons pu remarquer dans le chapitre précédent, la bioencapsulation nécessite un contrôle du pH, de la force ionique tout en évitant la formation d'alcool lors du processus d'hydrolyse des alcoxydes de silice. Ce dernier point suggère donc l'utilisation de la voie aqueuse pour la fabrication des matrices. L'élaboration des milieux solides magnétiques cytocompatibles peut être réalisée selon deux approches différentes. Nous pouvons soit incorporer des nanoparticules magnétiques au sein du gel, soit exposer les matrices de silice à un champ magnétique extérieur. La première approche nécessite l'utilisation de nanoparticules présentant de bonnes propriétés magnétiques sans exercer d'effet toxique sur les cellules. Dans cette situation, l'exposition au champ magnétique est interne au gel. La deuxième façon d'obtenir un champ est d'utiliser deux aimants placés de manière symétrique de part et d'autre du gel. Dans ce cas, la force du champ appliqué pourrait être plus importante que celle créée par les nanoparticules magnétiques.

Le choix des nanoparticules magnétiques s'est porté sur la magnétite (Fe_3O_4) en raison de ses propriétés ferrimagnétiques et jusqu'à présent, de l'absence de toxicité vis-à-vis des microorganismes. Ces nanoparticules magnétiques se retrouvent en très grand nombre dans l'environnement via les processus physicochimiques (dans les roches) (Wedepohl K. H., 1969) et de biominéralisation (Blakemore R. P., 1975). En effet, il existe une large variété d'êtres vivants capables de synthétiser la magnétite. Parmi ces organismes, on retrouve les mollusques (Lowenstam H. A., 1962), les abeilles (Gould *et al.,* 1978), les pigeons (Walcott *et al.,* 1979), les bactéries magnétotactiques (Frankel *et al.,* 1979), les dauphins (Zoeger *et al.,* 1980), les poissons (Walker *et al.,* 1984) et même les tissus humains (Kirschwink J.L., 1981 ; Kirschwink *et al.,* 1992).

La magnétite d'origine biogénique apporte une importante contribution à l'aimantation rémanente naturelle des sédiments (Vali *et al.,* 1987). A l'échelle nanométrique, celle-ci présente un grand intérêt dans les applications technologiques telles que la fabrication de ferrofluides (Enzel *et al.,* 1999), la médecine (traitement des cancers par hyperthermie, IRM, drug delivery,…) (Laurent *et al.,* 2008) et comme pigments (Buxbaum & Printzen, 1993). A l'heure actuelle, de nombreuses recherches ont été réalisées sur la synthèse des nanoparticules de magnétite par voie chimique

(Laurent *et al.,* 2008) ou bien en mimant les processus de biominéralisation (Baumgartner *et al.,* 2013[a,b] ; Arakaki *et al.,* 2010 ; Prozorov *et al.,* 2013).

En incorporant des nanoparticules de magnétite au sein des gels de silice, il est possible de concevoir des matériaux magnétiques tout en modulant leurs propriétés en variant la taille et la concentration des nanoparticules de magnétite. Dans ce chapitre, nous décrirons dans un premier temps, les différentes synthèses des nanoparticules de magnétite et leurs caractérisations. Puis dans un second temps, nous évoquerons l'élaboration et les caractérisations des différentes matrices magnétiques.

I. Synthèse des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) et caractérisations

A. Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques par procédé polyol et caractérisations

1. Synthèse des nanoparticules par voie polyol

La synthèse des nanoparticules d'oxydes métalliques par voie polyol consiste en l'hydrolyse forcée d'un sel métallique dans un polyol. Ce procédé permet d'obtenir des nanoparticules de taille contrôlée avec une distribution de taille restreinte (Ammar *et al.,* 2001 ; Chkoundali *et al.,* 2004 ; Ammar *et al.,* 2006). Le polyol joue ainsi le rôle de solvant, réducteur (particules métalliques) et complexant. La chélation du polyol sur les particules en formation conduit à limiter leur croissance et empêche l'agglomération de celles-ci.

La synthèse des nanoparticules de magnétite en milieu polyol est réalisée dans un ballon quadri-col dans lequel sont ajoutés une certaine quantité de poudre d'acétate de fer II (précurseur), d'eau et de diéthylène glycol (DEG) (Fig. 1). Le mélange est ensuite agité mécaniquement et chauffé jusqu'à la température de reflux. La température est contrôlée au moyen d'une boite de régulation thermique dont la rampe est fixée à 6°C/min. Une fois que le milieu réactionnel atteint la température de reflux, la réaction se déroule en 3 heures. Les différents protocoles de synthèse sont récapitulés dans le tableau 1.

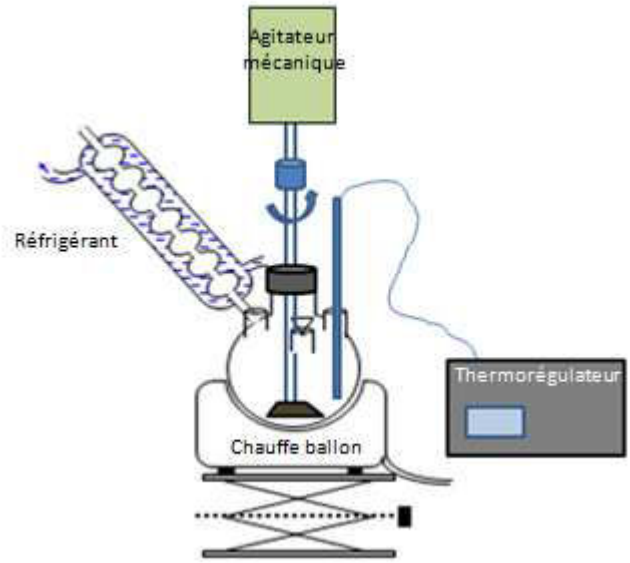


Figure 1 : Montage à reflux de la synthèse en milieu polyol

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents protocoles de synthèse en milieu polyol

Protocoles	Masse acétate de fer (g)	Quantité d'eau (ml)	Quantité de DEG (ml)	Durée de la réaction (h)	Concentration en fer (M)	Taux d'hydrolyse (h)
1	1,09	1	125	2h	0,05	8,8
2	5,45	5	125	3h	0,25	8,8
3	4,36	4	125	3h	0,20	8,8

En raison du faible rendement en nanoparticules obtenu avec le protocole de référence n° 1, nous avons optimisé le procédé de synthèse en augmentant la quantité d'acétate de fer et d'eau tout en conservant la même quantité de polyol et le même taux d'hydrolyse (n_{H2O}/n_{M+}) fixé à 8,8 (protocole n° 2 et 3). Les nanoparticules sont ensuite lavées afin d'éliminer le polyol. L'ensemble des produits de synthèse est lavé par centrifugation à 58 500 x g pendant 20 min avec de l'acétone. Une fois que toute la poudre est récupérée sous forme de culot, une série de lavages est alors effectuée afin d'obtenir des poudres ou des suspensions. Entre chaque centrifugation, le culot est soniqué et vortexé pour bien redisperser les nanoparticules.

Pour obtenir des suspensions, on effectue les lavages suivants :

- Deux lavages avec du glycérol à 10 % afin d'éliminer l'acétone et le DEG (diéthylène glycol). Le glycérol permet de faciliter la désorption du DEG restant sur les nanoparticules.

- Quatre lavages à l'eau milliQ pour éliminer le glycérol et les traces restantes de DEG

Les nanoparticules sont ensuite resuspendues dans de l'eau milliQ. La concentration en nanoparticules est déterminée par pesée après séchage à 60°C d'un millilitre de suspension.

Pour les caractérisations, la poudre est lavée trois fois dans l'éthanol afin d'éviter l'oxydation puis placée à 60°C durant une nuit.

2. Caractérisations des nanoparticules synthétisées par voie polyol

a) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

Les poudres issues des trois synthèses précédentes ont été analysées dans un premier temps par microscopie afin de comprendre l'effet de l'augmentation de la concentration en précurseur et en eau sur la taille des nanoparticules. En effet, l'augmentation des quantités de fer et d'eau pourrait conduire soit à une augmentation de la taille des nanoparticules en supposant que l'on conserve le même nombre de nucléis (croissance favorisée), soit il y aurait une augmentation du nombre de nanoparticules sans augmentation de la taille (nucléation favorisée).

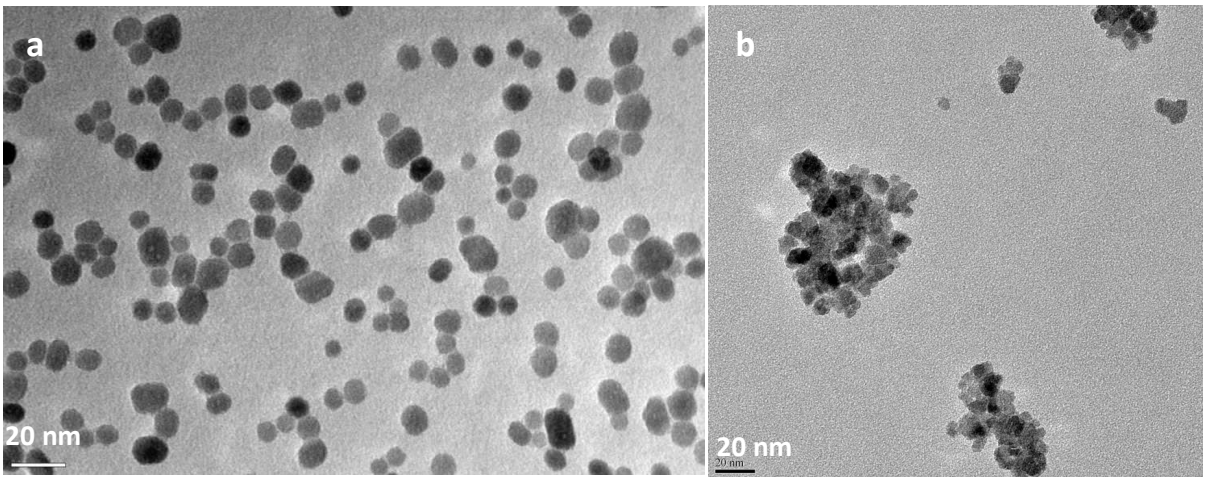


Figure 2 : Clichés MET des nanoparticules de magnétite synthétisées selon le protocole n°1 (a) et n°2 (b) (clichés réalisés par Gervaise Mosser)

D'après les observations en microscopie, les nanoparticules obtenues selon le protocole n° 1 avec 0,05 M de fer, sont de forme quasi-sphérique avec une taille moyenne de 10 nm (Fig. 2-a) tandis que les poudres issues du protocole n°2 avec une concentration en fer de 0,25 M, sont de forme hétérogène et très agrégées (Fig. 2-b).

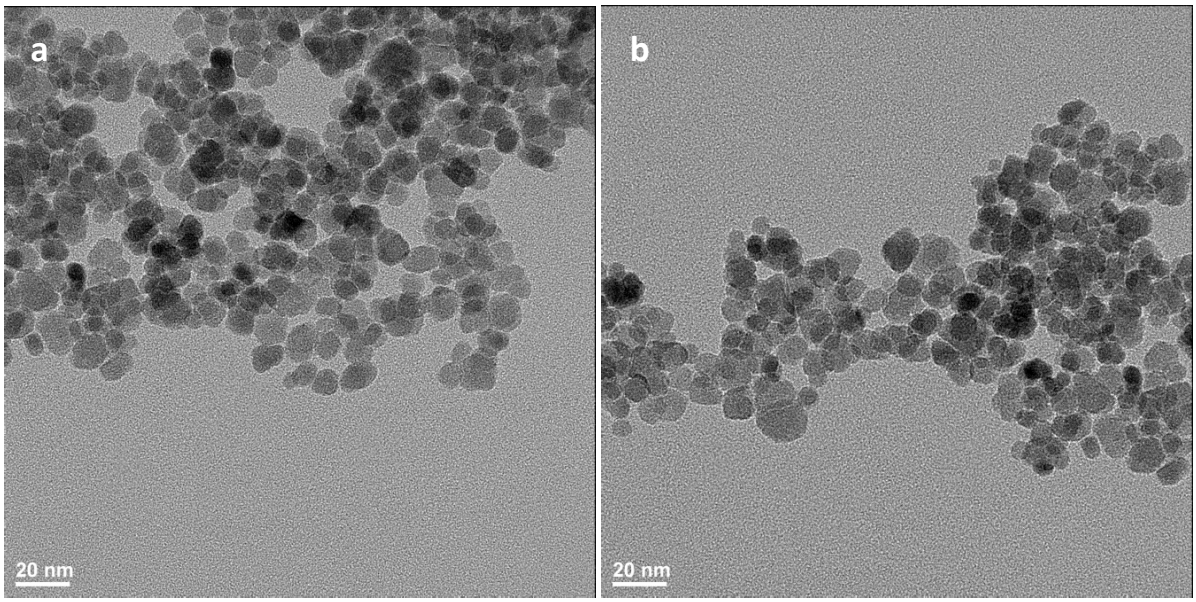


Figure 3 : Clichés des nanoparticules de magnétite observées au MET selon le protocole n° 3 (clichés réalisés par Jean-Michel Guigner)

Les nanoparticules synthétisées avec le protocole n° 3 ont une taille moyenne de 10 +/- 2 nm et sont de forme quasi-sphérique (Fig. 3-a et 3-b). La taille des particules est identique à celle obtenue lors du protocole n° 1. Nous pouvons ainsi remarquer que l'augmentation des quantités de fer et d'eau permet d'augmenter le nombre de nucléis plutôt que la croissance des particules. Lorsque la quantité de précurseurs (acétate de fer) est trop importante (0,25 M de fer), cela favorise l'agrégation des particules lors de la synthèse car les nanoparticules en formation ne sont pas suffisamment dispersées dans le polyol. La concentration en fer doit donc être inférieure à 0,25 M pour que l'on puisse avoir des résultats reproductibles avec des nanoparticules monodisperses quasi-sphériques et bien dispersées au cours de la synthèse en milieu polyol. Suite à ces observations, nous avons décidé d'utiliser le protocole n° 3 (0,2 M de fer) pour la suite des caractérisations et pour l'élaboration des matrices magnétiques.

b) *Diffraction des Rayons X (DRX)*

Les nanoparticules ont été caractérisées afin de déterminer la phase cristalline et la taille des cristallites grâce à la diffraction des rayons X. Les mesures ont été réalisées sur un domaine angulaire en (2Θ) compris entre 10 et 100° avec un pas de 0,033° et un temps de comptage 59 secondes par pas. L'appareil utilisé est un goniomètre XPert'Pro de la marque Panalitycal, utilisant la radiation du cobalt $\kappa\alpha$ dont la longueur d'onde est de 0,1789 nm. Dans le cas des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4), celles-ci peuvent s'oxyder en surface et parfois s'apparenter à de la maghémite (γ-Fe_2O_3)

dont les diffractogrammes sont très proches de la magnétite. Cependant, il existe plusieurs méthodes pour identifier la présence de maghémite. Les diffractogrammes ci-dessous (Fig. 4) ont été analysés au moyen du logiciel HighScore Plus permettant l'analyse des cristallites. La maghémite (JCPDS 39-1346) représentée en rouge, possède deux pics supplémentaires correspondant aux plans (210) et (211) (*) et les raies de diffraction sont légèrement décalées pour des angles supérieurs à 60° (2Θ). D'après le diffractogramme obtenu pour notre synthèse (représenté en bleu), celui-ci ne présente pas de plans supplémentaires confirmant ainsi la présence de magnétite selon la fiche JCPDS 75-0033 avec un paramètre de maille de 8,384 Å. Les nanoparticules semblent donc être protégées par une fine couche de polyol ralentissant ainsi l'oxydation de celles-ci.

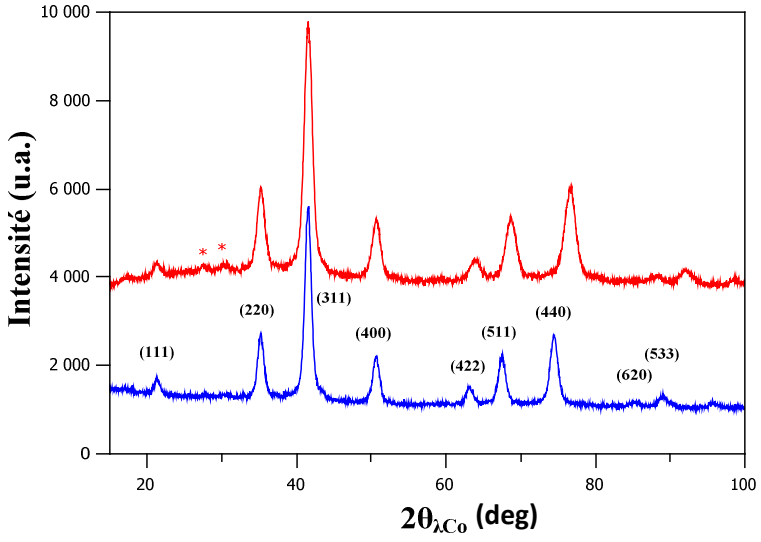


Figure 4 : Diffractogramme de la maghémite (rouge) et magnétite (bleu) synthétisées par voie polyol

La diffraction des rayons X permet également de déterminer la taille moyenne des cristallites. En effet, l'élargissement des pics de diffraction est inversement proportionnel à la taille. L'équation de Debye-Scherrer permet de déterminer la taille moyenne en relation avec la largeur d'un pic situé à un angle 2Θ dont voici la formule :

$$t = \frac{k \cdot \lambda}{(H - s) \cdot \cos\theta}$$

t : taille moyenne du domaine diffractant

k : facteur de correction (0,9)

λ : longueur d'onde (0,1789 nm)

H : largeur à mi hauteur des pics

s : largeur à mi-hauteur du pic principal de la référence

Θ : position du pic principal

Le calcul a été effectué pour chaque pic de diffraction afin d'obtenir une taille moyenne si l'on considère que les nanoparticules sont sphériques. Selon le calcul, le diamètre moyen des nanoparticules de magnétite est de 13 +/- 2 nm. Ces résultats concordent bien avec les observations en microscopie où l'estimation était de 10 +/- 2 nm par conséquent les particules sont monocristallines.

3. Caractérisations magnétiques des nanoparticules synthétisées par voie polyol

Les propriétés magnétiques d'un matériaux sont fortement dépendantes de la taille de ceux-ci et des conditions de synthèse. Afin de mieux comprendre comment se comporte nos particules, nous avons réalisé des analyses au moyen de deux techniques différentes. Nous avons utilisé le VSM (Vibrating Sample Magnetization) et le SQUID (Superconducting QUantum Interference Device).

a) *VSM (Vibrating Sample Magnetization)*

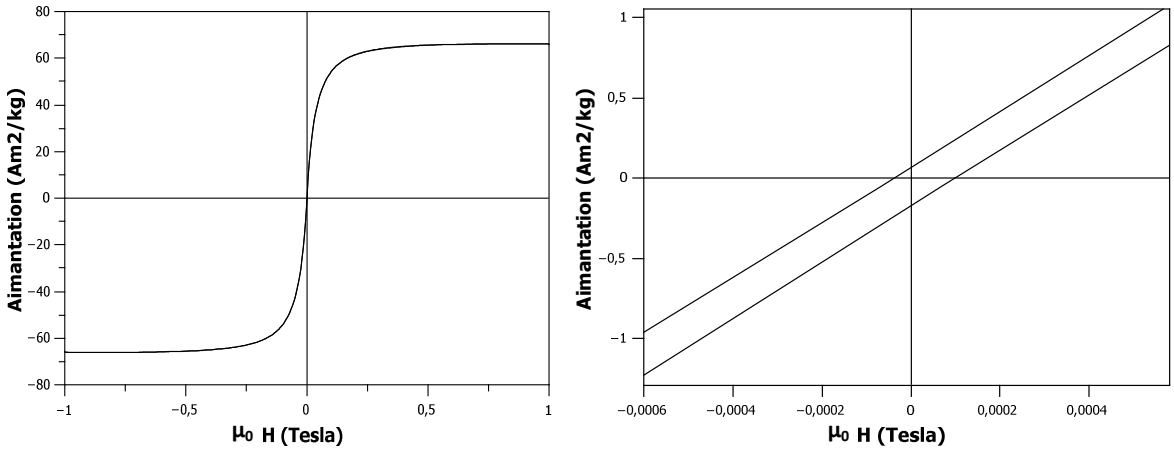


Figure 5 : Courbe d'aimantation de la magnétite synthétisée par voie polyol en fonction du champ magnétique appliqué à 300K

La courbe d'aimantation en fonction du champ magnétique extérieur appliqué à température ambiante est caractéristique des matériaux superparamagnétiques (Fig. 5). En effet, ceux-ci peuvent s'aimanter en présence du champ extérieur et possèdent une très faible aimantation rémanente à température ambiante. D'après la courbe d'aimantation, le champ coercitif (Hc) est de 0,07 mT, l'aimantation à saturation (Ms) est de 66 Am^2/kg et l'aimantation rémanente (Mr) est de 0,12 Am^2/kg.

L'aimantation à saturation est une propriété intrinsèque au matériau, dépendante de la température mais non dépendante de la taille des particules.

Cependant, il faut noter également que la présence d'une fine couche de polyol autour des particules peut avoir une contribution diamagnétique sur le matériau. Toutefois, si l'on compare la valeur d'aimantation à saturation avec celle des nanoparticules de même taille préparées par chimie douce, celle-ci est plus importante lorsque les particules sont synthétisées par voie polyol (Gonzalez-Sandoval *et al.,* 2004). Nous constatons donc que le type de synthèse joue un rôle important sur les propriétés magnétiques des matériaux.

b) *SQUID (Superconducting QUantum Interference Device)*

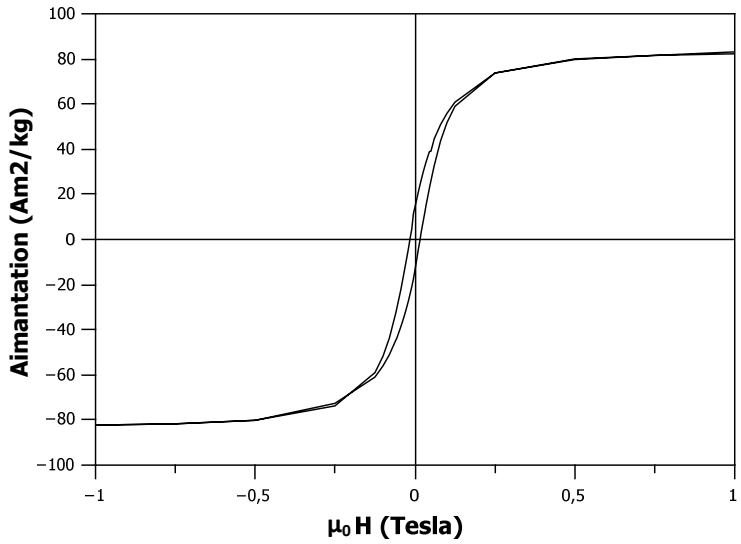


Figure 6 : Courbe d'aimantation de la magnétite synthétisée par voie polyol en fonction du champ appliqué à 10K

Grâce au magnétomètre SQUID, les analyses ont pu être réalisées à 10 K. La courbe d'aimantation révèle une aimantation rémanente de 13 Am^2/kg, une aimantation à saturation de 83 Am^2/kg et un champ coercitif de 15,8 mT (Fig. 6). Nous pouvons ainsi distinguer une petite hystérèse à basse température. En effet, à 10 K l'aimantation des nanoparticules ne fluctue pas sous l'effet de l'énergie thermique. Elles peuvent donc saturer à 1 T et acquérir une rémanence. L'hystérèse d'un matériau dépend de la taille des grains, du domaine magnétique et de la température.

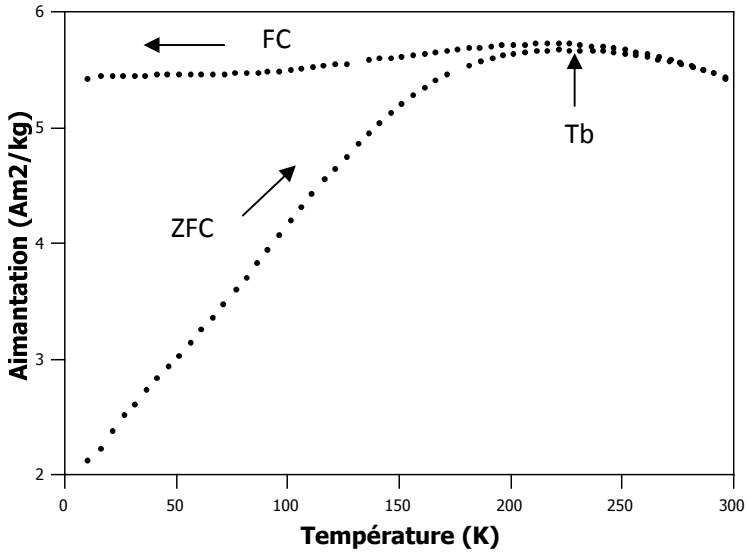


Figure 7 : Courbes FC (Field Cooled) et ZFC (Zero Field Cooled) de l'aimantation en fonction de la température pour la magnétite synthétisée par voie polyol

Les courbes FC (Field Cooled) et ZFC (Zero Field Cooled) de l'aimantation de la magnétite en fonction de la température sous un champ de 50 Oe, sont présentées dans la figure 7. Lors de la mesure pour la courbe ZFC, l'échantillon est d'abord refroidi à 10 K en absence d'un champ. Puis l'aimantation est mesurée tous les ΔT pendant la montée en température jusqu'à 300 K sous un champ de 50 Oe. L'obtention de la courbe FC se réalise par une mesure de l'aimantation pendant la diminution de la température (de 300 K à 10 K) sous un champ de 50 Oe. Nous pouvons remarquer que la courbe ZFC croit progressivement avec l'augmentation de la température sous un champ de 50 Oe, puis elle atteint une valeur maximale correspondant à la température de blocage et décroit de nouveau. Pour la courbe FC, une diminution de la température entraîne une augmentation de l'aimantation qui va ensuite atteindre un plateau.

Les courbes FC et ZFC décroissent simultanément lorsque la température augmente au-delà de la température critique (température d'irréversibilité). La température de blocage (Tb) est déterminée à partir du maximum de la courbe ZFC et correspond à 230 K. La température d'irréversibilité se trouve au niveau du croisement des deux courbes à 270 K environ.

Dans la partie suivante, nous essayerons de comprendre comment ces particules se comportent en solution et notamment d'un point de vue de leur stabilité.

4. Charge de surface et dynamique des nanoparticules en suspensions

Les nanoparticules d'oxyde métallique en suspension possèdent une charge électrique de surface pouvant être conditionnée par des réactions acido-basiques (protonation/ déprotonation) ou d'adsorption (Sigg *et al.,* 2000). Il peut alors se produire les réactions de surface suivantes conduisant à des charges positives ou négatives au niveau de la particule :

$$FeOH + H^+ \rightarrow FeOH_2^+ \text{ (protonation)}$$

$$FeOH \rightarrow FeO^- + H^+ \text{ (déprotonation)}$$

$$SOH + Me^{2+} \rightarrow SOMe^+ + H^+ \text{ (adsorption d'ions positifs)}$$

$$SOH + HL^- \rightarrow SL^- + H_2O \text{ (adsorption de ligands)}$$

S : surface, Me^{2+} : ion positif et L : ligand

La charge de surface peut être déterminée par une mesure de mobilité électrophorétique caractérisée par la vitesse des particules dans un champ électrique. Il est alors possible de déterminer le pH pour lequel les nanoparticules ne possèdent aucune charge. Il s'agit du point isoélectrique dont la valeur peut varier en fonction de l'adsorption des ions positifs ou négatifs en surface ou bien en fonction de l'hétérogénéité et des impuretés présentes sur la surface des nanoparticules. Dans le cas de la magnétite le point isoélectrique se trouve aux alentours de 6,5 (Sigg *et al.,* 2000).

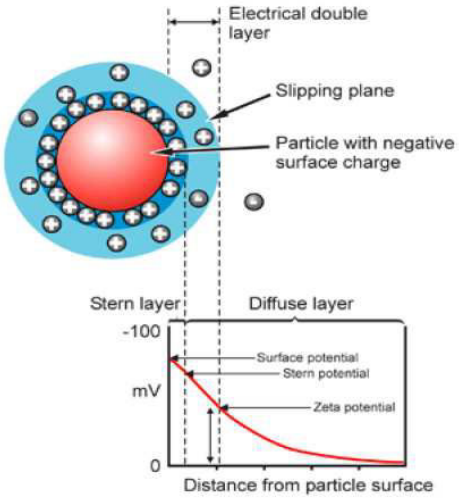


Figure 8 : Représentation schématique des interactions de surface des oxydes métalliques

Lorsque les particules sont chargées négativement, celles-ci possèdent une « couche fixe » d'ions positifs l'entourant (Fig. 8). Il s'agit de la couche de Stern au delà de laquelle se trouve la «

couche diffuse » dont la limite est appelée potentiel zêta. Il s'agit du potentiel électrique au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule. Ainsi, plus la particule est chargée, plus la valeur du potentiel zêta est élevée en valeur absolue et contribue ainsi à la stabilité de la particule en suspension. Le potentiel zêta dépend du pH, de la concentration en ions et des espèces ioniques en solution.

La théorie de DLVO (Derjaguin and Landau, Verwey and Overbeek) décrit les forces s'exerçant entre les surfaces chargées dans un milieu liquide (attractions de van der Waals et répulsions électrostatiques) et leurs effets en solution. Ce modèle considère qu'il existe une interaction totale (V_T) égale à la somme de l'attraction de van der Waals (V_A) et de l'interaction répulsive électrostatique (V_R). Il permet ainsi de déterminer si les particules sont stables ou agrégées en solution. La stabilité des particules dépend de la force ionique, de la charge des contre-ions et du potentiel de surface (Sigg *et al.,* 2000).

Les modifications du pH et de la force ionique de la solution peuvent moduler les répulsions électrostatiques et ainsi contrôler la stabilité des suspensions de nanoparticules. Les groupements fonctionnels à la surface des nanoparticules peuvent se protoner ou déprotoner en fonction du pH, conduisant ainsi à un changement de la charge de surface. Un pH proche ou égal à la valeur du point isoélectrique conduit à une diminution ou disparition des répulsions électrostatiques provoquant l'agrégation des nanoparticules.

a) *Potentiel zêta*

Afin de déterminer la charge de surface des nanoparticules en solution à pH 7, nous avons préparé deux suspensions dont l'une contient seulement de l'eau milliQ et l'autre 10 % de glycérol afin de voir l'effet du glycérol sur la charge et l'agrégation des nanoparticules. Nous avons utilisé du glycérol en raison de sa viscosité et de sa biocompatibilité. Plusieurs paramètres ont été fixés dont le coefficient d'adsorption de la magnétite à 1 et l'indice de réfraction de la magnétite à 2,42. Le tableau ci-dessous résume la liste des paramètres utilisés pour les différentes solutions.

Tableau 2 : Paramètres utilisés pour les mesures de potentiel zêta

	Solutions	
paramètres	**10% glycérol**	**eau MilliQ**
viscosité (20°C) mPa.s	1,31	1
indice de réfraction (20°C)	1,34	1,33
constante diélectrique (20°C)	77,55	80,3

Les deux suspensions ont été préparées afin d'obtenir une concentration en magnétite de 0,04 g/L. Les valeurs de potentiel zêta sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Potentiel zêta de la magnétite en suspension dans l'eau milliQ et 10% de glycérol à pH 7

Suspensions à pH 7 (0,04 g/L)	Potentiel zêta (mV)
Magnétite 10% glycérol	-37 (+/-3)
Magnétite eau milliQ	-25 (+/-1)

Comme nous pouvons remarquer, les nanoparticules de magnétite ont une charge négative s'élevant à -25 mV en absence de glycérol à pH 7. En présence de glycérol à 10 %, la charge des nanoparticules augmente légèrement et passe à -37 mV. L'adsorption du glycérol à la surface des nanoparticules semble donc influencer la charge de celles-ci. Le glycerol comporte des chaines hydrocarbonées avec de multiples groupes hydroxyl permettant ainsi la formation de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau (Farnum & Zukoski, 1999). Il a été montré que ce polyol permettait de stabiliser les protéines et d'augmenter l'hydratation de la surface des particules (Sousa R., 1995 ; Priev *et al.,* 1996). Selon les études de Farnum & Zukoski 1999, le glycérol augmente les répulsions entre les protéines BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor), ce qui conforte bien les résultats obtenus lors de notre analyse.

b) *Diffusion dynamique de lumière (Dynamic Light Scattering)*

La vitesse d'agrégation des nanoparticules en suspension est un paramètre important dans la conception des matrices magnétiques. En effet, les nanoparticules de magnétite sont soumises aux interactions magnétiques et aux forces d'attraction (van der Waals) et de répulsion (électrostatique). Afin d'obtenir des matrices les plus homogènes possibles, il est donc important de stabiliser au mieux les nanoparticules en suspension avant de les intégrer au gel.

Comme le glycérol augmente la viscosité du milieu et la charge (en valeur absolue) des nanoparticules, nous avons réalisé une étude afin de déterminer la vitesse d'agrégation des nanoparticules en solution au cours du temps. Deux suspensions à pH 7 ont alors été préparées avec une concentration en magnétite de 0,04 g/l dans de l'eau milliQ contenant ou non 10 % de glycérol. Les deux suspensions ont été placées au bain à ultrason pendant 15 min afin de bien disperser les nanoparticules. L'évolution de la taille des particules au cours du temps est alors déterminée par diffusion dynamique de lumière durant 50 min. Cette méthode permet de mesurer le diamètre hydrodynamique pour une gamme de tailles allant du nanomètre au micron.

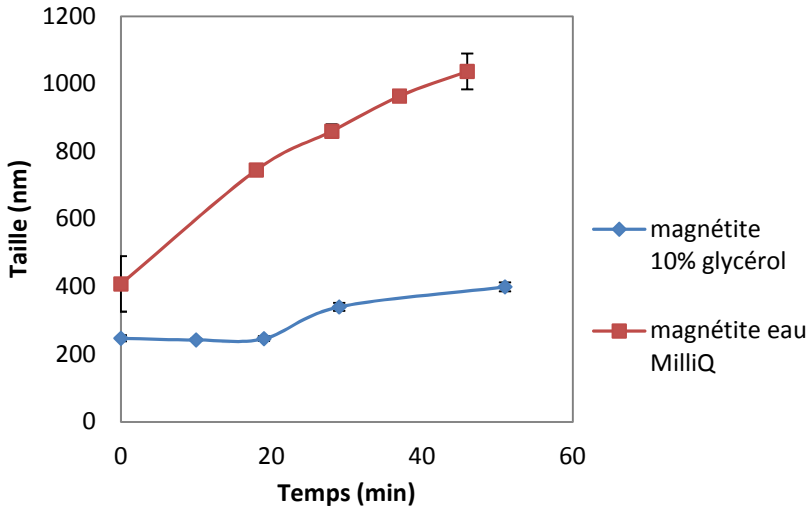


Figure 9 : Evolution de la taille des nanoparticules de magnétite en suspension dans l'eau milliQ et 10 % glycérol au cours du temps

D'après le graphique présentant l'évolution de la taille des particules en fonction du temps (Fig. 9), nous pouvons remarquer que pour les deux suspensions, les nanoparticules sont agrégées même après sonication probablement en raison des interactions magnétiques. En effet, la taille déterminée par diffusion de lumière est plus importante que celle observée au MET où le diamètre moyen des nanoparticules était de 10 nm. Les nanoparticules en suspension dans l'eau milliQ sans glycérol tendent à s'agréger de plus en plus au cours du temps. Cependant les agrégats présents dans l'eau contenant du glycérol restent stables au cours du temps. Le glycérol semble donc diminuer fortement l'agrégation des particules. En raison de la viscosité un peu plus importante du milieu et de l'augmentation de la charge des nanoparticules en présence de glycérol, il existe un ralentissement visible de l'agrégation. Suite à l'observation de ces résultats, nous avons décidé de préparer des suspensions de magnétite en présence de glycérol pour permettre la réalisation des matrices magnétiques dans des conditions optimales en s'affranchissant de l'agrégation rapide des nanoparticules.

5. Conclusion

Les synthèses de magnétite par voie polyol, nous ont permis d'obtenir des nanoparticules de 10 nm monodisperses et monocristallines présentant un comportement superparamagnétique. Bien que ces nanoparticules ne présentent pas d'aimantation rémanente à température ambiante, elles possèdent d'autres avantages. De par leur petite taille, il a été possible de ralentir l'agrégation des nanoparticules par sonication et dispersion dans du glycérol. La stabilisation des nanoparticules au cours du temps joue un rôle important dans l'élaboration des matrices afin d'obtenir une bonne dispersion des particules au sein des gels. Nous verrons plus loin que ces nanoparticules ont également permis d'établir le protocole de fabrication des gels de manière plus aisée que si nous avions utilisé des particules avec de fortes interactions magnétiques.

Dans la partie suivante, nous décrirons la méthode de synthèse de microsphères et leurs caractérisations.

B. Synthèse de microsphères par voie solvothermale et caractérisations

1. Synthèse des nanoparticules par voie solvothermale

Les microsphères ont été synthétisées par voie réductrice solvothermale selon le protocole de Deng *et al.,* 2005. Au cours de la synthèse, il se produit une réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} grâce à l'éthylène glycol et au polyéthylène glycol. L'ajout d'acétate de sodium dans le milieu permet d'éviter l'agglomération des particules et de créer une stabilisation électrostatique.

Pour la synthèse des nanoparticules par voie solvothermale, 4,05 g de $FeCl_3.6H_2O$ sont mélangés avec 120 ml d'éthylène glycol par forte agitation magnétique jusqu'à dissolution complète du chlorure ferrique. 10,8 g d'acétate de sodium et 3 g de polyéthylène glycol sont ensuite ajoutés et la mixture est placée sous agitation vigoureuse pendant 30 min. La solution est ensuite introduite dans une « bombe » à autoclave puis chauffée dans un four à 200°C durant 9h. La taille des nanoparticules est dépendante du temps de réaction et de la concentration en précurseur.

2. Caractérisations des nanoparticules synthétisées par voie solvothermale

a) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

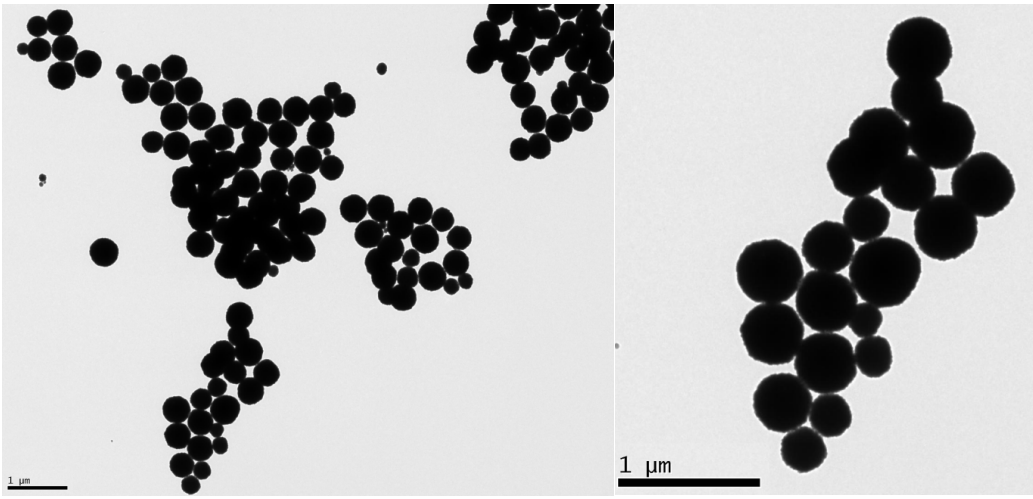


Figure 10 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées par voie solvothermale (clichés réalisés par Carole Aimé)

Les particules de magnétite ont été caractérisées en microscopie électronique en transmission afin de déterminer leur taille, forme et dispersion (Fig. 10). L'analyse statistique a montré que les particules avaient un diamètre moyen de 400 +/- 88 nm (22 % de dispersion). Ces microsphères semblent donc légèrement polydisperses.

b) *Diffraction des rayons X (DRX)*

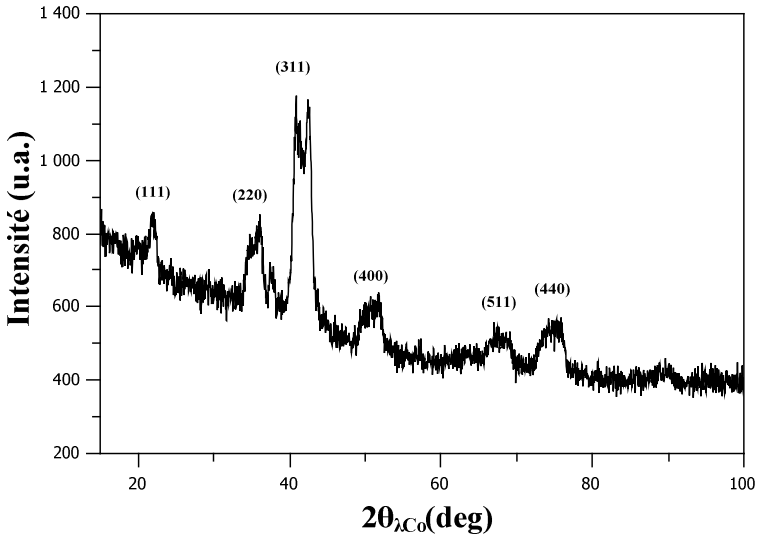


Figure 11 : Diffractogramme de la magnétite obtenue par voie solvothermale

Les caractérisations par DRX ont confirmé la présence de magnétite (JCPDS 03-0862) dont le paramètre de maille est de 8,374 Å (Fig. 11). En ce qui concerne la taille, l'analyse a estimé un diamètre moyen de 7,8 +/- 0,9 nm. L'agglomération des petites particules primaires de 8 nm a donc conduit à la formation de plus grosses sphères secondaires de 400 nm.

3. Caractérisations magnétiques des nanoparticules synthétisées par voie solvothermale

a) *VSM (Vibrating Sample Magnetization)*

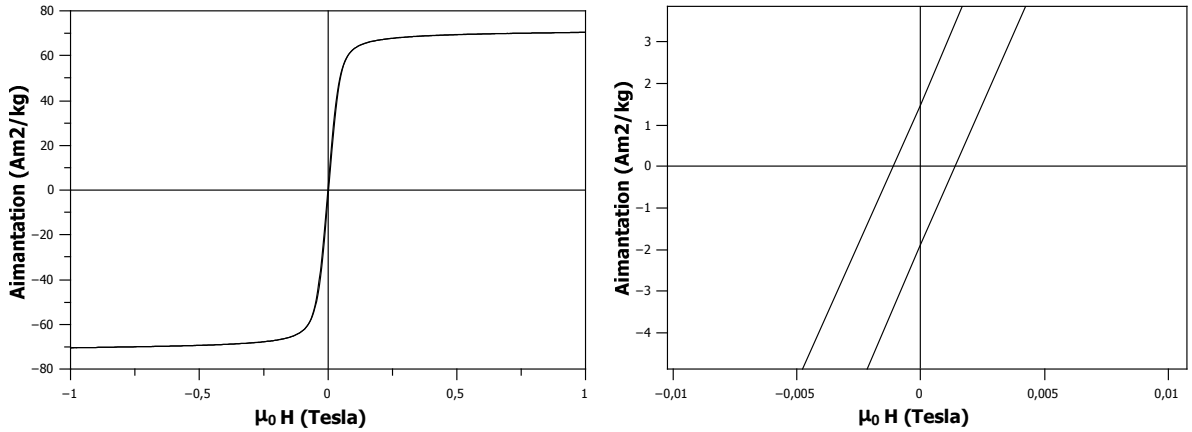


Figure 12 : Courbe d'aimantation de la magnétite synthétisée par voie solvothermale en fonction du champ magnétique appliqué à 300K

La courbe d'aimantation présentée ci-dessus (Fig. 12), montre une aimantation à saturation de 71 Am^2/kg. L'aimantation rémanente reste faible mais est toutefois plus élevée (Mr = 1,68 Am^2/kg) que celle de la magnétite obtenue par voie polyol (Mr = 0,12 Am^2/kg). L'agglomération des petites particules pour former de plus grosses lors de la synthèse, semble donc augmenter légèrement la rémanence. Le champ coercitif nécessaire pour annuler la rémanence (Hcr) est de 8,5 mT et le champ coercitif (Hc) est de 1,3 mT. La valeur de Hcr ne figure pas sur le graphique et peut être obtenue selon la méthode décrite dans l'annexe 7. Afin de déterminer les caractéristiques des domaines magnétiques, nous pouvons calculer les rapports Mr/Ms et Hcr/Hc (cf. Annexe 14). Dans le cas des microsphères, les valeurs de Mr/Ms et Hcr/Hc sont de 0,02 et 6,5. Ces informations nous montrent que malgré une taille importante des particules, celles-ci sont superparamagnétiques, indiquant ainsi que les nanoparticules agglomérées n'interagissent pas entre elles.

4. Conclusion

Les particules de magnétite produites par voie solvothermale semblent légèrement polydisperses avec une taille moyenne de 400 nm. Malgré le fait que ces particules acquièrent une légère rémanence, celles-ci ne peuvent pas produire un champ suffisamment important au sein des matrices de silice. Suite à ces observations, nous avons décidé de synthétiser des nanoparticules monodomaines afin d'augmenter la rémanence à température ambiante. Les protocoles de

synthèses et les caractérisations des particules monodomaines seront décrits dans la suite de ce chapitre.

C. Synthèse des nanoparticules monodomaines par thermo-hydrolyse et caractérisations

Un nouveau protocole de synthèse des nanoparticules monodomaines a été élaboré en collaboration avec deux stagiaires : Ambroise Quesne-Turin (Master 1 NMS, Université Paris 7, 2013) et Seifeddine Ben Azzouz (Master 2 NMS, Université Paris 7, 2014). En effet, les nanoparticules de magnétite synthétisées par voie polyol étant superparamagnétiques, celles-ci ne permettent pas l'élaboration de matrices magnétiques avec une aimantation rémanente à température ambiante. En ce qui concerne les particules synthétisées par voie solvothermale, leur aimantation rémanente est très faible et ne permettrait pas de concevoir des matrices suffisamment magnétiques. C'est pourquoi nous avons entrepris une nouvelle méthode de synthèse découverte de manière inattendue au laboratoire. Après plusieurs tests réalisés afin de mieux comprendre cette synthèse et les conditions expérimentales, plusieurs protocoles ont été élaborés dans le but de déterminer les conditions optimales pour synthétiser des nanoparticules monodomaines de taille supérieure à 30 nm les plus monodisperses possible.

La synthèse des nanoparticules de magnétite se déroule en deux étapes en débutant par la synthèse du précurseur par voie polyol puis la synthèse des nanoparticules de magnétite par thermo-hydrolyse. Nous décrirons dans un premier temps la synthèse et la caractérisation du précurseur, puis dans un second temps, les différentes synthèses des nanoparticules de magnétite et leurs caractérisations.

1. Synthèse du précurseur alcoxyde de fer par voie polyol

Un mélange d'acétate de fer, d'eau et de polyol est ajouté dans un ballon quadri-col et chauffé jusqu'à 262°C sous agitation. La rampe de température est fixée à 6°C/min au moyen d'une boite de régulation thermique. La réaction se déroule en 3h une fois que le milieu réactionnel atteint la température fixée. La poudre verte foncée d'alcoxyde de fer est ensuite récupérée par lavages successifs dans l'éthanol et centrifugation à 48 500 x g pendant 10 min. Le produit est ensuite séché à l'étuve à 60°C pendant une nuit. Les différents protocoles sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 4 : Différents protocoles de synthèse du précurseur

Protocoles	Masse acétate de fer (g)	Quantité d'eau (ml)	Quantité de glycérol (ml)	Durée de la réaction (h)	Concentration en fer (M)	Taux d'hydrolyse (h)
1	2,18	2	250	3h	0,05	8,8
2	6,54	6	250	3h	0,15	8,8

Le protocole n° 1 correspond à la synthèse de référence élaborée selon la méthode de synthèse des nanoparticules de magnétite par voie polyol décrite auparavant mais en remplaçant le diéthylène glycol par du glycérol. Le protocole n° 2 a été réalisé afin d'augmenter le rendement en précurseur tout en conservant le même taux d'hydrolyse que pour la synthèse n° 1.

2. Caractérisations du précurseur alcoxyde de fer synthétisé par voie polyol

a) *Diffraction des Rayons X*

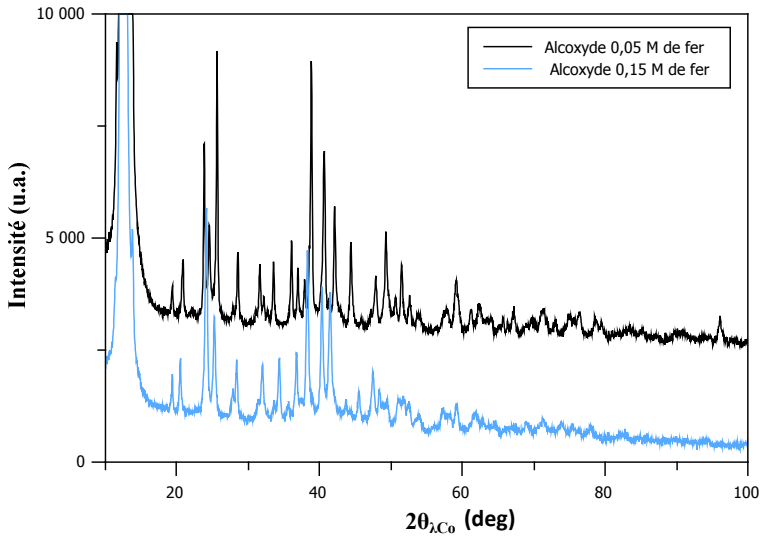


Figure 13 : Diffractogrammes des précurseurs alcoxyde de fer à 0,05 M de fer (en noir) et 0,15 M de fer (en bleu)

L'alcoxyde contenant 0,05 M de fer (représenté en noir) a été identifié comme un glycérolate de fer selon la fiche JCPDS 25-1983 et dont le paramètre de maille est inconnu (Fig. 13). Le produit avait déjà été identifié par Radoslovich *et al.,* 1970 et synthétisé à partir d'un oxalate de fer. La formule chimique du glycérolate de fer est la suivante : $[(C_3H_5O_3)_4\ Fe^{2+}{}_3\ Fe^{3+}{}_2]$.

Pour l'alcoxyde de fer obtenu selon le protocole n° 2 (en bleu), les pics de diffraction se superposent avec ceux du protocole n° 1 jusqu'à 43° (2θ) puis diffèrent légèrement à des angles supérieurs. Cependant pour les deux synthèses, il existe un pic très intense correspondant au plan (001) à 12,5° (2θ) et caractéristique des glycérolates de fer selon Rodrique *et al.,* 1978. Ces résultats nous laissent donc penser que les deux synthèses contiennent des glycérolates de fer avec des taux d'hydratation et de cristallinité variables. En raison de la présence d'une plus grande quantité d'eau dans la synthèse n° 2, l'oxydation du fer II en fer III n'est pas négligeable. L'alcoxyde de fer peut donc contenir plus de fer III dans sa structure, ce qui peut conduire probablement à de légères modifications structurales.

b) *Analyse thermogravimétrique (ATG)*

Afin de mieux identifier la composition des différents produits de synthèse, nous avons réalisé une analyse thermogravimétrique. Les mesures ont été effectuées avec une montée en température de 5°C/min jusqu'à 1000°C. Grâce à cette technique, il est possible de tracer une courbe représentant la perte de masse en fonction de la température.

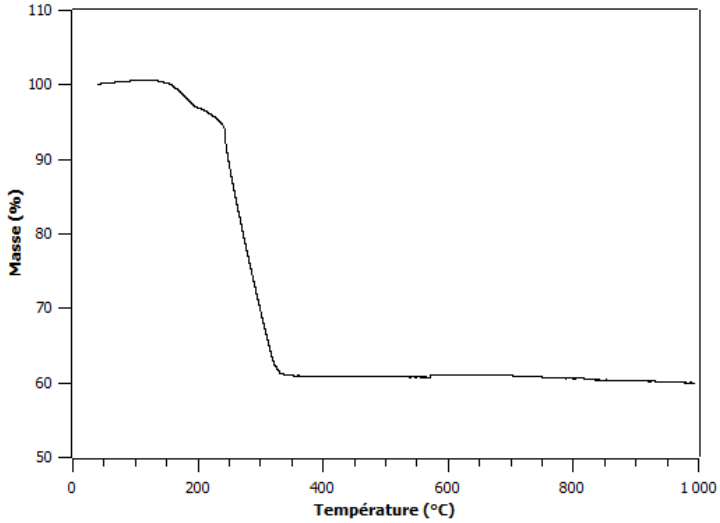


Figure 14 : Courbe ATG réalisée sur la poudre d'alcoxyde de fer à 0,05 M de fer

Pour le composé obtenu avec 0,05 M de fer, la perte de masse se déroule en deux étapes (Fig. 14). Entre 120 et 210°C, nous avons une diminution de 4 % de la masse du produit. Celle-ci correspond à l'eau physisorbée (adsorbée) à la surface de la poudre. Puis entre 210 et 370°C, la décomposition de la matière organique du composé se produit et nous pouvons observer une perte de masse de 36 %. Au-delà de 370°C, il ne reste plus que la phase minérale composée d'oxyde de fer.

Si l'on soustrait la masse d'eau, il y aurait 37,5 % de matière organique et 62,5 % de matière minérale.

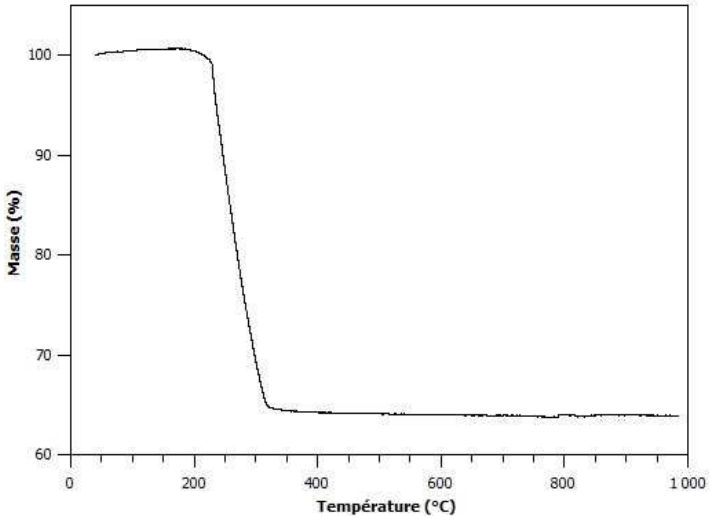


Figure 15 : Courbe ATG réalisée sur la poudre d'alcoxyde de fer à 0,15 M de fer

Pour l'alcoxyde à 0,15 M de fer, une seule perte de masse de 36 % se produit entre 170°C et 420°C (Fig. 15). Il s'agit de la matière organique en décomposition.

D'après ces résultats, on peut donc en déduire que les compositions des deux poudres sont très proches. Pour l'alcoxyde à 0,05 M, il y a 37,5 % de matière organique tandis que l'alcoxyde à 0,15 M de fer possède 36 % de matière organique justifiant ainsi les observations légèrement différentes des diffractogrammes obtenus par diffraction des rayons X.

c) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

Comme nous pouvons remarquer dans la figure 16, les particules d'alcoxyde de fer sont de taille micrométrique polydisperse et en forme de plaquettes.

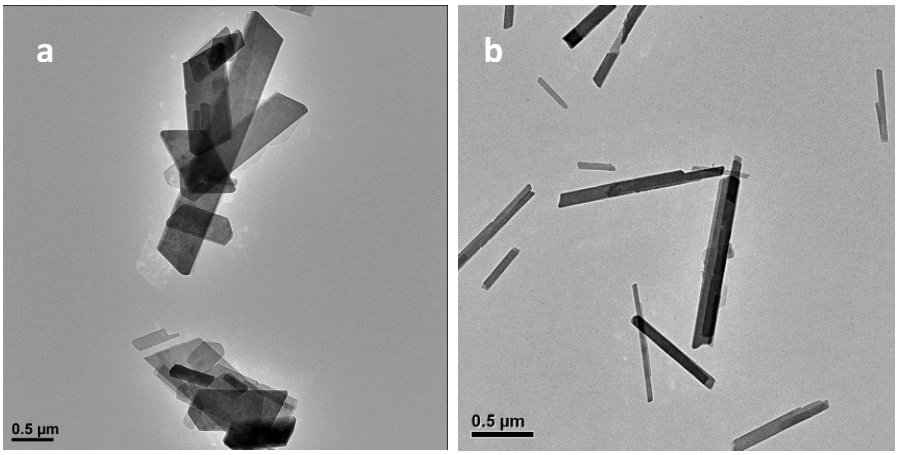


Figure 16 : Observations au MET des alcoxyde à 0,05 M en fer (a) et 0,15 M en fer (b)

3. Caractérisations magnétiques du précurseur alcoxyde de fer synthétisé par voie polyol

a) *VSM (Vibrating Sample Magnetization)*

D'après les analyses en VSM, les précurseurs alcoxyde à 0,05 et 0,15 M de fer présentent un comportement paramagnétique (Fig. 17). Ils s'aimantent de manière linéaire en fonction de la force du champ appliqué sans saturer.

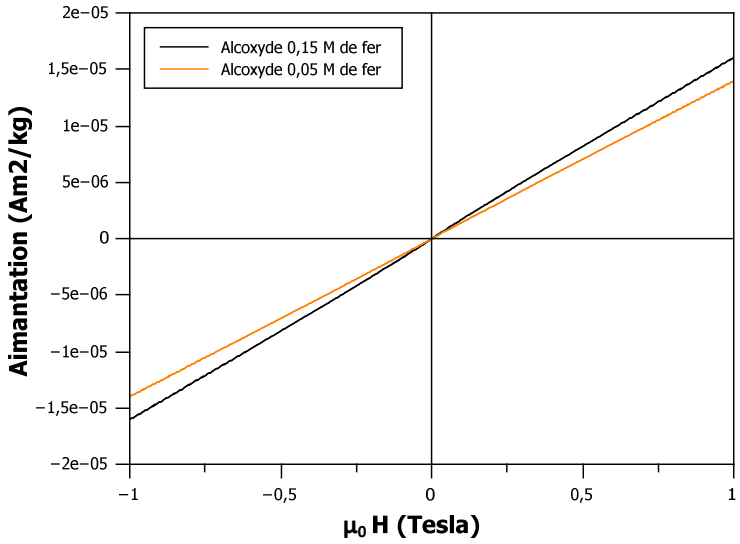


Figure 17 : Courbe d'aimantation des alcoxydes à 0,05 M et 0,15 M de fer en fonction du champ magnétique appliqué à 300K

4. Synthèse des nanoparticules de magnétite par thermo-hydrolyse

Les nanoparticules de magnétite ont été synthétisées grâce au précurseur alcoxyde de fer par thermo-hydrolyse. Plusieurs protocoles ont été réalisés afin de déterminer les conditions les plus adaptées pour obtenir des particules monodomaines les plus monodisperses possible. Les synthèses ont été élaborées en variant la concentration en polyol et en précurseur. L'intérêt de l'utilisation du polyol au cours de la synthèse réside dans sa capacité à contrôler la taille, la forme et la distribution de tailles des nanoparticules. Il joue un rôle de réducteur permettant ainsi de conserver les ions Fe (II) en solution au cours de la synthèse et il peut se chélater aux particules en formation, ce qui facilite ainsi la séparation des étapes de nucléation et croissance et donc la monodispersité.

Les synthèses ont été effectuées en présence de diéthylène glycol (DEG). Le précurseur sous forme solide est mélangé dans un certain volume d'eau et de polyol puis la suspension est placée sous agitation dans un ballon quadri-col et chauffée jusqu'à la température d'ébullition. La synthèse se déroule ensuite en 5 heures. Voici les différents protocoles testés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Protocoles de synthèse des nanoparticules de magnétite par thermo-hydrolyse

	% de DEG				
	0 %	25%	50%	75%	90%
Précurseurs (mg)	200	200	200	200	200
Eau (ml)	200	75	50	25	10
Polyol (ml)	0	25	50	75	90

Les synthèses en absence de DEG sont réalisées dans un bécher et chauffé à 97°C pendant 3h sous agitation magnétique (sans barreau aimanté). Les nanoparticules en formation vont naturellement tourner avec le champ magnétique. Pour les caractérisations, la poudre est lavée trois fois à l'éthanol et concentrée au moyen d'un aimant. Entre chaque lavage, la suspension est placée au bain à ultrason. Les poudres sont ensuite séchées une nuit à 60°C. Pour la préparation des suspensions, les particules sont lavées trois à l'eau milliQ puis resuspendues dans 10 % de glycérol.

5. Caractérisations des nanoparticules de magnétite synthétisées par thermo-hydrolyse

a) *Diffraction des rayons X (DRX)*

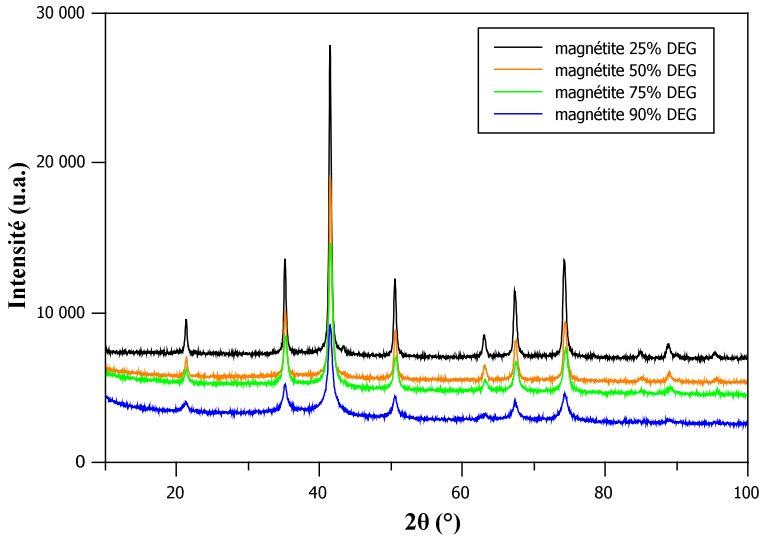


Figure 18 : Diffractogrammes obtenus pour les différentes synthèses de magnétite

Les diffractogrammes obtenus pour chaque synthèse à différents pourcentages de polyol se superposent parfaitement et diffèrent seulement au niveau de la largeur des pics (Fig. 18). En effet, la concentration en polyol semble influencer la taille des nanoparticules. L'analyse a également confirmé que toutes les synthèses y compris celles réalisées dans l'eau, correspondaient à de la magnétite selon la fiche JCPDS 75-0033. La taille moyenne des nanoparticules a été déterminée grâce à l'équation de Scherrer dont voici un tableau récapitulatif.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des synthèses avec l'estimation de la taille des nanoparticules par DRX

Précurseur	Echantillon	Moyenne (nm)	Ecart type (nm)	% écart type
Alcoxyde 0,05 M de fer	magnétite 0% DEG	57	11	19
Alcoxyde 0,15 M de fer	magnétite 0% DEG	50	7	15
Alcoxyde 0,05 M de fer	magnétite 25% DEG	45	16	17
Alcoxyde 0,05 M de fer	magnétite 50% DEG	32	2	6
Alcoxyde 0,05 M de fer	magnétite 75% DEG	20	2	8
Alcoxyde 0,05 M de fer	magnétite 90% DEG	14	2	14

Les nanoparticules de magnétite synthétisées dans l'eau avec le précurseur à 0,05 M de fer, ont une taille moyenne de 57 +/- 11 nm et semblent polydisperses (19 % de dispersion). La magnétite produite avec le précurseur à 0,15 M de fer présente une taille de 50 +/-7 nm avec une dispersion de

15 %. Le diamètre moyen des nanoparticules diffère en fonction du pourcentage de polyol. En effet, la présence de polyol semble contrôler la taille et la distribution de tailles des nanoparticules. La figure 19 montre une très bonne corrélation entre le diamètre moyen des particules et le pourcentage de polyol utilisé au cours de la synthèse. Nous pouvons remarquer que plus la concentration en polyol augmente, plus la taille des particules diminue.

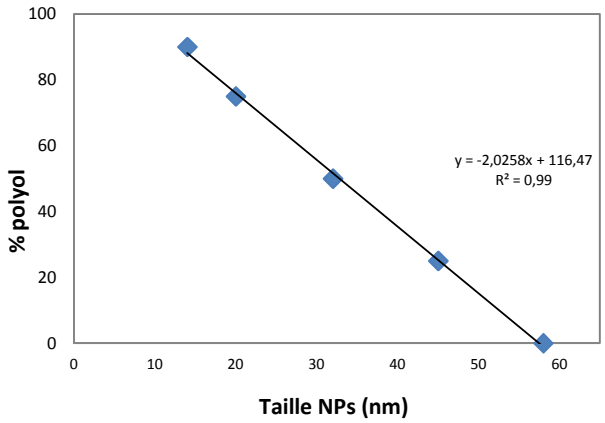


Figure 19 : Corrélation entre la taille des nanoparticules et la concentration de polyol dans la synthèse

Ces analyses nous montrent qu'il est alors possible d'obtenir des particules de taille désirée en contrôlant simplement la quantité de polyol au cours de la synthèse.

b) *Microscope Electronique en Transmission (MET)*

Les images MET confirment bien que plus le milieu réactionnel est concentré en polyol, plus les nanoparticules sont petites. Dans chacune des synthèses, les particules semblent sphériques et très agrégées probablement en raison des fortes interactions magnétiques ou bien à cause de la méthode de synthèse. En effet, la transformation des nanoparticules de magnétite par thermo-hydrolyse des alcoxydes de fer se produit progressivement au sein des plaquettes de précurseur qui sont très agrégées dans la solution lors de la synthèse malgré l'agitation. Suite à ces observations, il était donc très difficile de déterminer la taille moyenne des particules par analyse statistique sur les clichés MET.

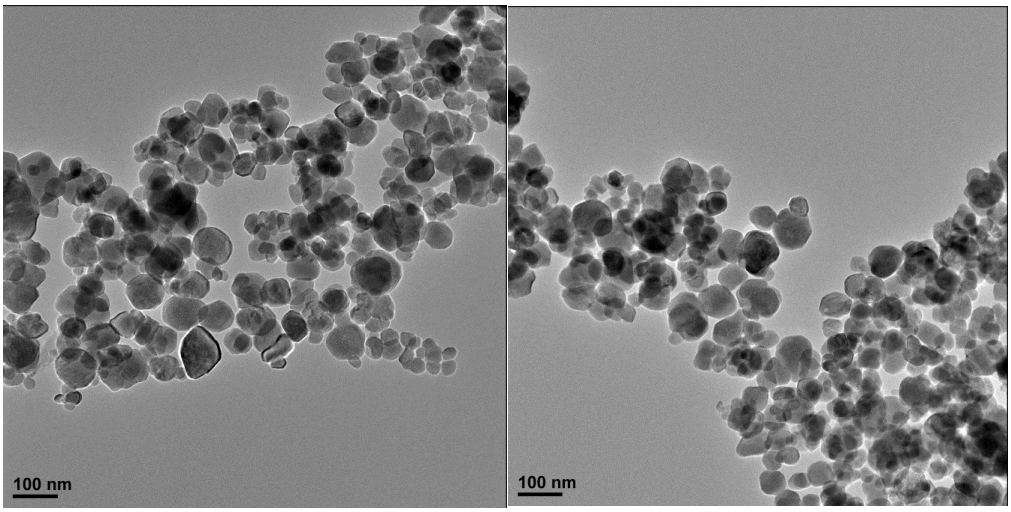


Figure 20 : Observation au FEG des nanoparticules synthétisées dans l'eau à partir de l'alcoxyde à 0,05 M de fer

Les nanoparticules synthétisées dans l'eau à partir du précurseur à 0,05 M de fer semblent polydisperses avec des tailles très variables (Fig. 20).

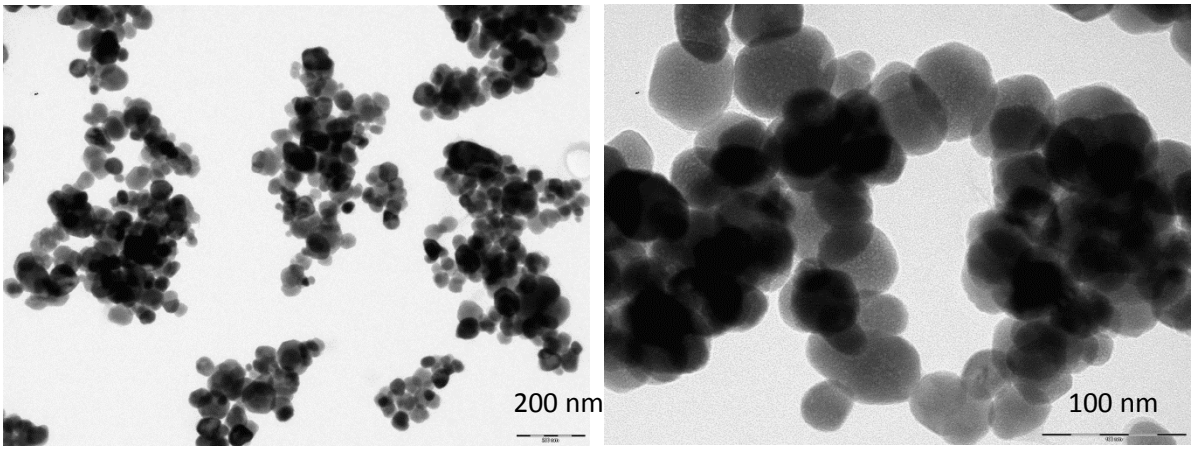


Figure 21 : Observation au MET des nanoparticules synthétisées dans l'eau à partir de l'alcoxyde à 0,15 M de fer (photos réalisées par Ludovic Mouton)

Selon la figure 21, les particules paraissent monodisperses avec une taille moyenne de 50 nm, ce qui conforte bien les estimations par DRX.

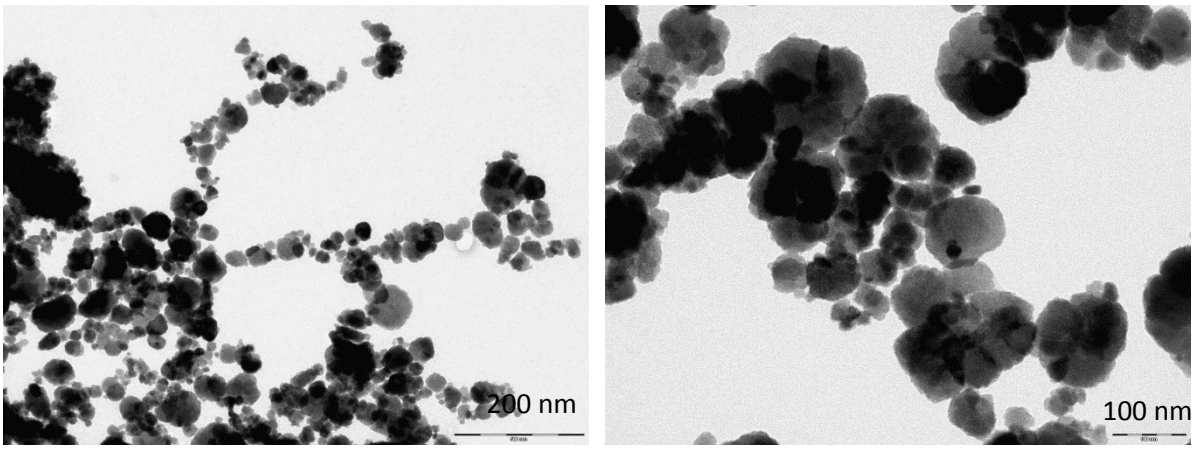


Figure 22 : Observation au MET des nanoparticules synthétisées dans 25 % DEG à partir de l'alcoxyde à 0,05 M de fer (photos réalisées par Ludovic Mouton)

Nous pouvons remarquer que les nanoparticules obtenues dans 25 % de DEG (Fig. 22), sont polydisperses. En effet, étant donnée la faible concentration en DEG, le polyol contrôle moins la taille des particules et semble avoir une influence sur la forme. Toutefois, une analyse statistique est nécessaire pour pouvoir confirmer ces observations qui ne sont pas très représentatives.

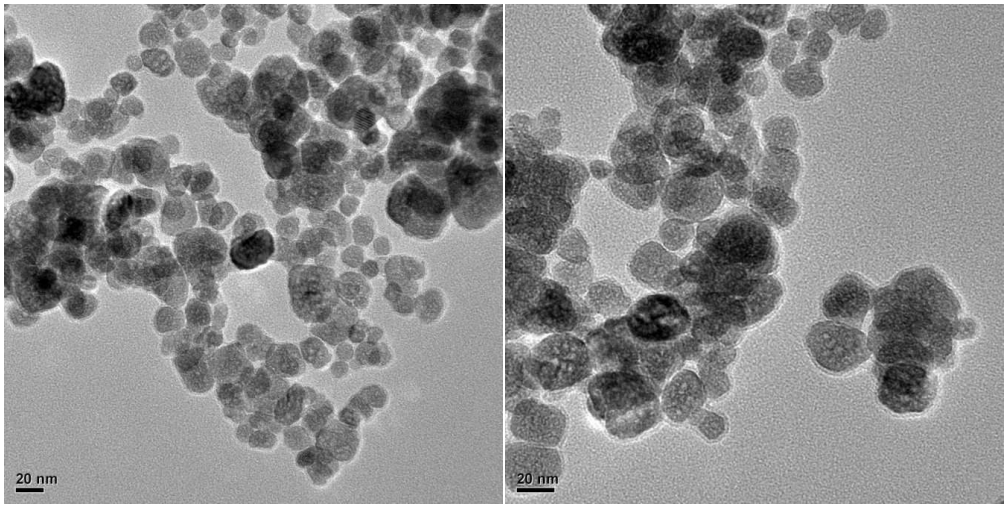


Figure 23 : Observation au MET des nanoparticules synthétisées dans 50% DEG à partir de l'alcoxyde à 0,05 M de fer

La figure 23, nous montre qu'en présence de 50 % de DEG, il y a un meilleur contrôle de la distribution de taille des particules, ce qui concorde bien avec l'analyse par diffraction des rayons X. Nous pouvons constater que les nanoparticules présentent des « pores ». Toutefois, ces observations ne permettent pas de conclure qu'il s'agit bien de particules poreuses. Il se pourrait qu'il y ait du polyol restant qui réagirait sous le faisceau d'électron donnant l'impression de structures poreuses.

6. Caractérisations magnétiques des nanoparticules de magnétite synthétisées par thermo-hydrolyse

a) *VSM (Vibrating Sample Magnetization)*

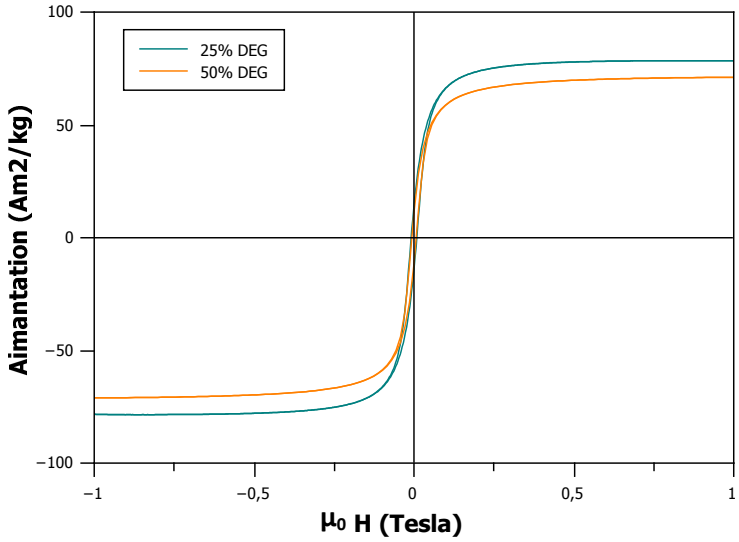


Figure 24 : Courbes d'aimantation de la magnétite synthétisée par thermo-hydrolyse en fonction du champ magnétique appliqué à 300K

Les courbes d'aimantation de la magnétite obtenues dans 25 % de DEG (en vert) et 50 % de DEG (en orange) sont présentées dans la figure 24. La présence d'une hystérèse et d'une aimantation rémanente à température ambiante montrent que les nanoparticules sont ferrimagnétiques monodomaines.

L'ensemble des valeurs d'aimantation et de champ coercitif sont regroupées dans le tableau 7. L'aimantation à saturation des particules est comprise entre 71 et 80 Am^2/kg en fonction du type de synthèse. Les rapports Mr/Ms et Hcr/Hc sont de 0,2 et 2 environ pour toutes les synthèses. Ces caractéristiques montrent bien que toutes les nanoparticules sont monodomaines entre 45 et 57 nm.

Tableau 7 : Valeurs d'aimantation et de champ coercitif des nanoparticules de magnétite obtenues par thermo-hydrolyse en fonction de la taille

Synthèses	Taille (nm)	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Hc (mT)	Hcr (mT)	Mr/Ms	Hcr/Hc
Eau (alcoxyde 0,15M de fer)	50	80	21	14,9	24,7	0,3	1,7
Eau (alcoxyde à 0,05 M de fer)	57	78	19	10,2	16,7	0,2	1,6
25 % DEG (alcoxyde 0,05 M de fer)	45	78	14	8,8	17,8	0,2	2
50 % DEG (alcoxyde 0,05 M de fer)	32	71	11	6,7	15	0,2	2,2

Nous pouvons remarquer que l'aimantation rémanente (Fig. 25) et le champ coercitif (Fig. 26) varient en fonction de la taille des nanoparticules synthétisées à partir de l'alcoxyde à 0,05 M de fer.

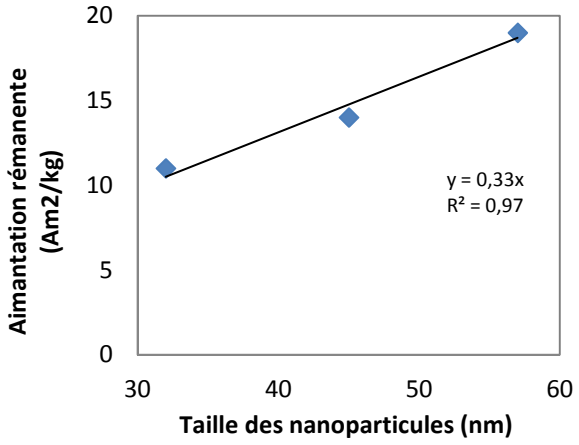


Figure 25 : Corrélation entre l'aimantation des nanoparticules et leur taille

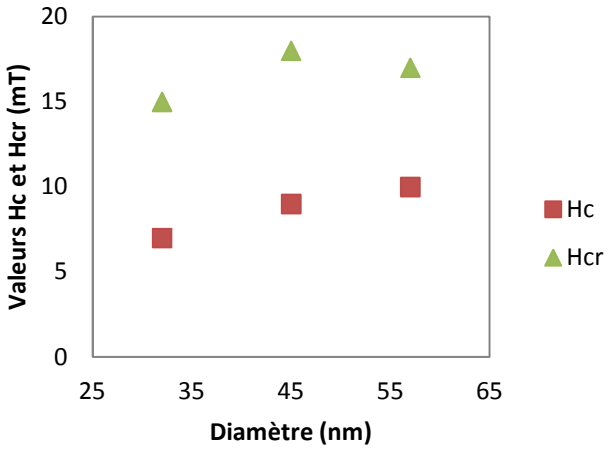


Figure 26 : Corrélation entre la taille des particules et les champs coercitifs (Hc et Hcr)

7. Conclusion

Nous avons vu que les synthèses par thermo-hydrolyse d'un précurseur alcoxyde de fer, permettent d'obtenir des nanoparticules monodomaines monodisperses dont la taille peut être définie en modulant la concentration en polyol dans le milieu. Les particules présentent des propriétés magnétiques très intéressantes avec une aimantation rémanente plus ou moins importante en fonction de leur taille.

D. Bilan

Les nanoparticules de magnétite ont été synthétisées selon différentes méthodes : voie polyol, solvothermale ou thermo-hydrolyse. En fonction du procédé, il est possible d'obtenir des particules avec des tailles et des propriétés magnétiques différentes. Le tableau 8 regroupe l'ensemble des propriétés des nanoparticules en fonction du procédé de synthèse.

Tableau 8 : Propriétés magnétiques des différentes synthèses en fonction de la taille des nanoparticules

Procédé de synthèse	Taille (nm)	Propriété	Aimantation à saturation Ms	Aimantation rémanente Mr	Champ coercitif Hc	Champ coercitif Hcr
Polyol	10	superparamagnétique	66	0,12	0,07	
Solvothermal	400	superparamagnétique	71	1,68	1,3	8,5
Thermo-hydrolyse	45	monodomaine	78	14	8,8	17,8

Parmi tous les procédés de synthèse, seule la voie par thermohydrolyse permet d'obtenir des nanoparticules monodomaines avec une aimantation rémanente à température ambiante. Ces particules permettront de concevoir des gels dont les propriétés peuvent être contrôlées en modulant la concentration en magnétite.

Les particules élaborées selon les différents protocoles permettront de réaliser des gels magnétiques aux propriétés magnétiques différentes en fonction de la taille des particules. La conception et la caractérisation de ces matériaux seront décrites dans la partie suivante.

II. Elaboration des matrices magnétiques et caractérisations

A. Protocoles d'élaboration des gels de silice et des gels magnétiques

Le procédé sol-gel utilisé pour la réalisation des matrices de silice en voie aqueuse permet de concevoir des gels cytocompatibles pour l'encapsulation des microorganismes en s'affranchissant de la production d'alcool généré par voie alcoolique. Les gels sont produits par la neutralisation d'une solution de silicate de sodium (1 mL ; 0,4 M) en présence de silice colloïdale commerciale (LUDOX® HS-40) (1 mL ; 8,65 M). L'acide silicique va alors condenser à pH 7 et polymériser pour former un réseau tridimensionnel (Nassif *et al.,* 2002). L'ajout de silice colloïdale permettait dans ce cas d'augmenter la concentration en silice afin de diminuer le temps de gel tout en réduisant la concentration en ions sodium présent dans la solution de silicate. Pour l'élaboration des matrices magnétiques, nous avons modifié ce protocole en remplaçant la silice colloïdale par une suspension de nanoparticules de magnétite.

1. Mode opératoire

Le silicate de sodium (1 ml ; 0,8 M) à pH 12 est mélangé avec 1 ml de suspension de nanoparticules de magnétite contenant 10 % de glycérol (préalablement soniquée pendant 10 min). La mixture est placée sous agitation à 400 rpm au moyen d'un agitateur orbital puis elle est neutralisée avec de l'acide chlorhydrique (155 µl ; 4 M). Après 5 secondes, 1 ml de tampon phosphate contenant 10 % de glycérol est ajouté. Le mélange est agité à 400 rpm pendant plusieurs minutes puis à 320 rpm pendant quelques secondes. L'agitation décroissante permet d'obtenir un gel homogène. Le temps de gel est de 6 à 7 min environ à 20°C (Fig. 27). Pour le gel de silice (contrôle), le

protocole reste le même sauf que la suspension de nanoparticules de magnétite est remplacée par de l'eau milliQ contenant 10 % de glycérol. Par la suite les bactéries seront ajoutées avec le tampon phosphate à 10 % en glycérol.

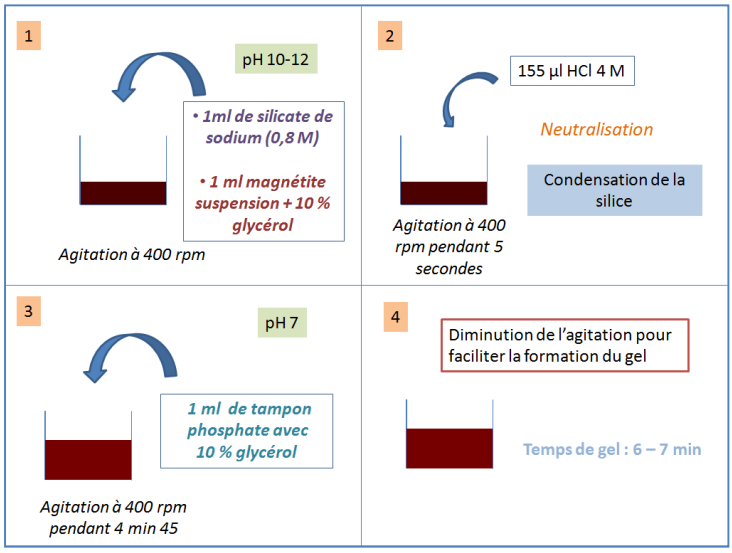


Figure 27 : Formation des matrices magnétiques selon le procédé sol-gel

L'homogénéisation des gels par agitation orbitale est une étape importante. Comme nous travaillons avec des nanoparticules magnétiques, il est nécessaire de ne pas utiliser une agitation magnétique avec un aimant afin d'éviter l'interaction nanoparticules-aimant. De plus, lors de la formation du gel, les nanoparticules de magnétite s'agrègent entre elles en raison des interactions magnétiques et de la diminution du pH. La vitesse et le temps d'agitation sont des paramètres importants qui doivent être bien contrôlés afin de limiter une agrégation trop importante des nanoparticules de magnétite et leur sédimentation.

La solution de silicate de sodium utilisée est deux fois plus concentrée que celle habituellement employée lors de la conception des gels de silice dans des conditions cytocompatibles. En effet, les gels de silice sont généralement réalisés avec 0,4 M de silicate de sodium et 8,65 M de silice colloïdale de 10 nm. En remplaçant la silice colloïdale par des particules de magnétite très faiblement concentrées, le gel se formait au bout de 45 min. Afin de diminuer le temps de gélification, nous avons utilisé une solution de silicate de sodium plus concentrée (0,8 M). En effet, nous pouvons voir dans la figure 28 que le temps de gel augmente lorsqu'on diminue la concentration en silicate de sodium. Pour la bioencapsulation, le temps de gel doit être relativement court pour éviter un stress trop important sur les bactéries. Cependant, en augmentant la concentration en silicate, la quantité d'ions sodium est plus élevée et la neutralisation par l'acide chlorhydrique apporte des ions chlorure. Les gels ainsi formés contiennent 0,15 M de sels NaCl, qui

peuvent provoquer un stress osmotique pour les bactéries. C'est pourquoi il est nécessaire d'ajouter un additif, le glycérol, pour permettre la protection des cellules face aux sels.

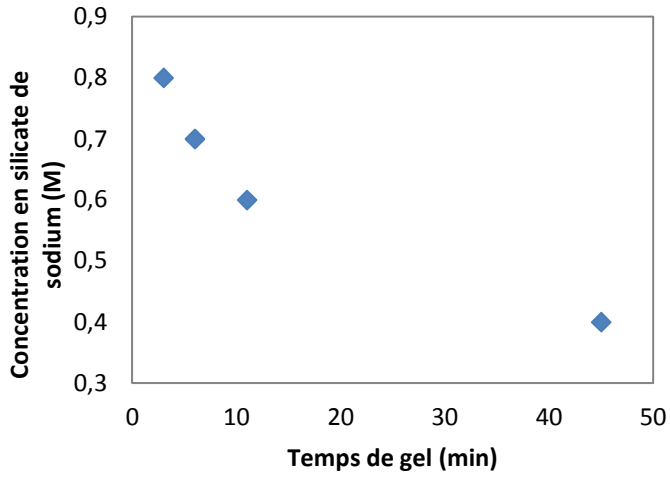


Figure 28 : Influence de la concentration en silicate de sodium sur le temps de gel (25°C)

Les gels ont d'abord été conçus avec de la magnétite superparamagnétique à différentes concentrations afin de déterminer les quantités optimales en nanoparticules pour avoir des gels les plus homogènes possibles et afin de tester par la suite la viabilité des cellules. Des concentrations variables à 1,25 ; 2,5 et 5 g/l en magnétite ont servi pour la conception des gels (Fig. 29). Comme nous pouvons remarquer sur la photo, les matrices sont homogènes quelle que soit la concentration en magnétite. Nous verrons par la suite si les propriétés macroscopiques corroborent avec les observations microscopiques.

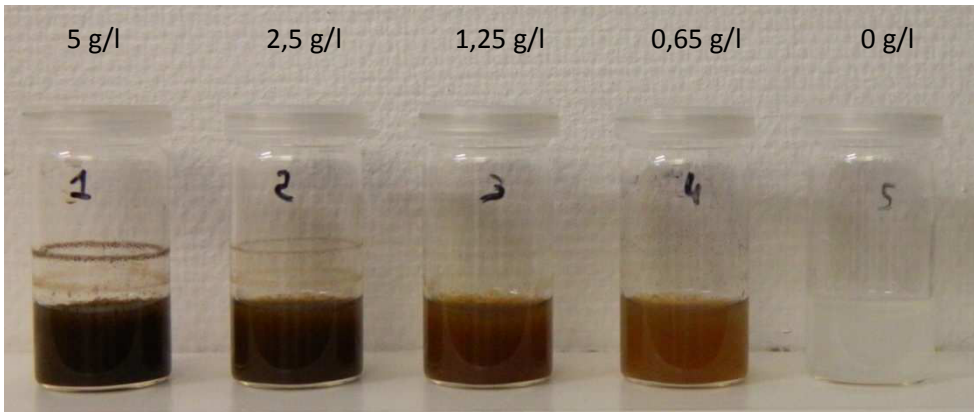


Figure 29 : Photo des gels obtenus avec différentes concentrations en magnétite

Pour les gels élaborés avec des nanoparticules monodomaines de 32 nm, nous pouvons remarquer une très forte agrégation des particules en raison des interactions magnétiques importantes (Fig. 30).

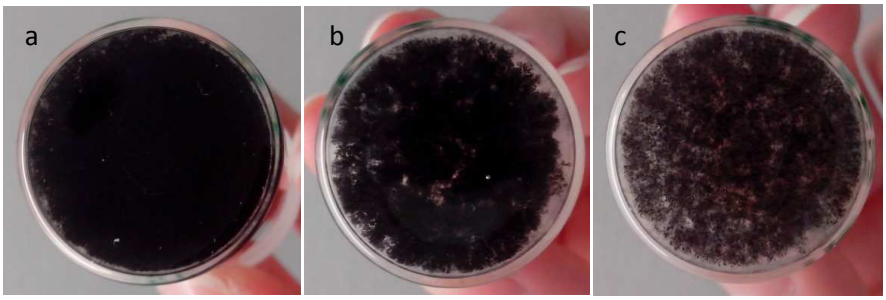


Figure 30 : Photos des gels conçus avec des suspensions de nanoparticules de magnétite de 32 nm à 10 g/l (a), 5 g/l (b) et 2,5 g/l (c)

B. Caractérisations des différents gels

1. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 10 nm

a) *Diffraction des Rayons X (DRX)*

La caractérisation par DRX est réalisée sur des gels deshydratés et séchés par point critique (cf. Annexe 1).

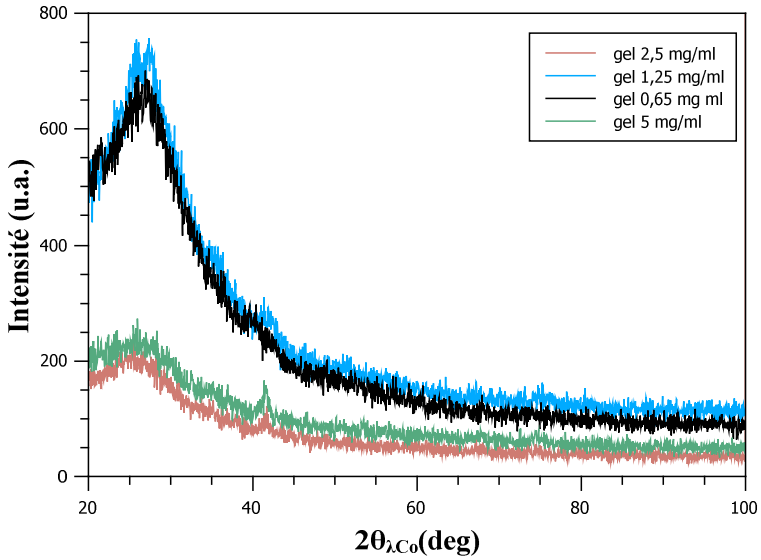


Figure 31 : Diffractogrammes obtenus pour les gels de silice conçus avec différentes concentrations en magnétite : 0 ; 1,25 ; 2,5 et 5 g/l

Selon les diffractogrammes obtenus pour les aérogels réalisés à partir de suspensions de nanoparticules de magnétite concentrées à 0,65 ; 1,25 ; 2,5 et 5 g/l, nous pouvons remarquer que la présence de silice est marquée par un pic prédominant à 25,6° (2Θ) confirmée par la fiche JCPDS 29-0085 (Fig. 31). Nous pouvons également observer un pic plus ou moins intense à 41° (2Θ)

correspondant au plan (311) de la magnétite. L'intensité de ce pic varie en fonction de la concentration en magnétite. L'analyse a donc permis de confirmer la présence de la magnétite et de la silice dans les aérogels.

b) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

Les gels ont été observés au MET après leur deshydratation et imprégnation dans la résine afin d'obtenir des coupes de chaque échantillon (cf. Annexe 4). Cette méthode permet de conserver l'échantillon tout en préservant sa structure initiale sans la déformer. Les coupes des différents gels ont été réalisées au bout de 24h.

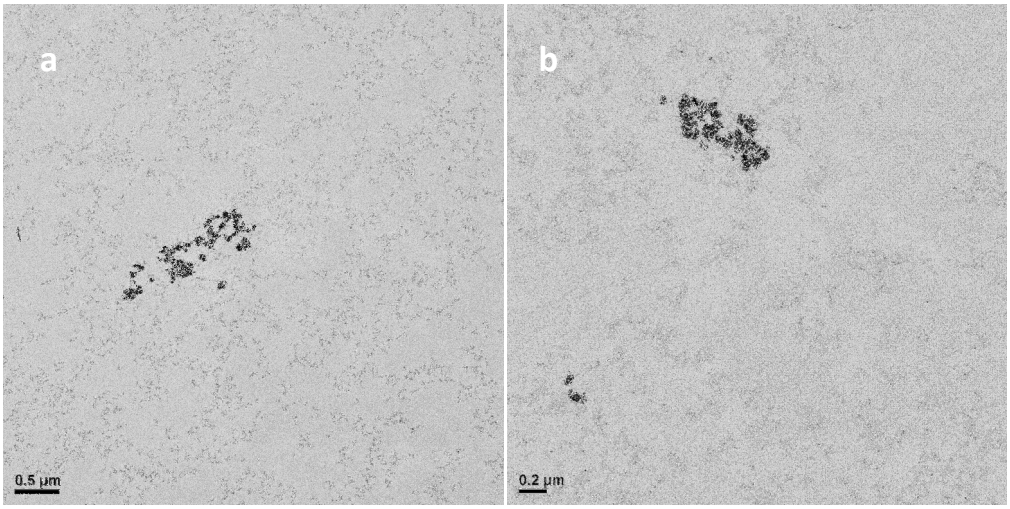


Figure 32 : Coupes de gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l (a) et 2,5 g/l (b)

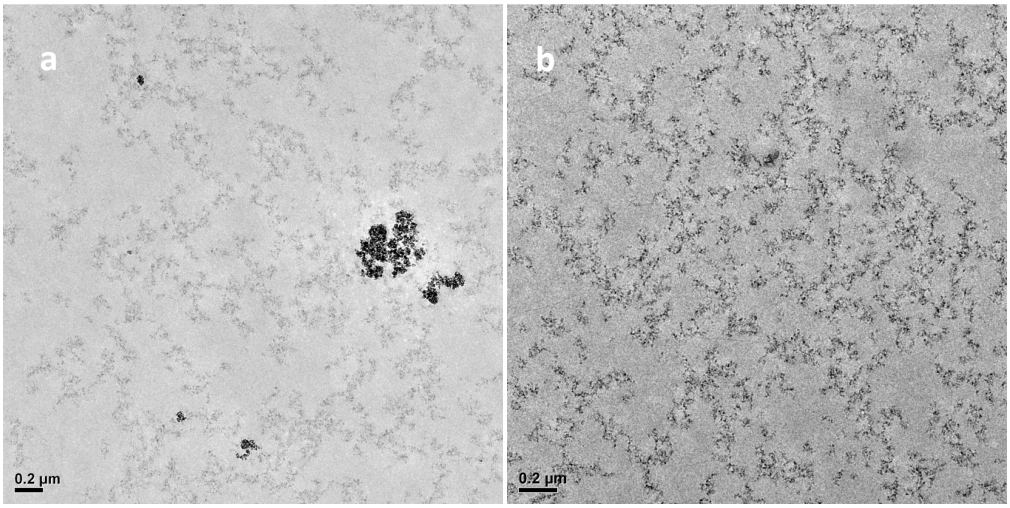


Figure 33 : Coupes de gels conçus avec une suspension de magnétite à 1,25 g/l (a) et 0 g/l (b)

Nous pouvons remarquer que les nanoparticules de magnétite sont agrégées dans le réseau de silice (Fig. 32 et 33). Quelle que soit la concentration en nanoparticules de magnétite, l'agrégation

reste identique. Nous pouvons donc penser que les agrégats de magnétite sont dispersés de manière homogène dans les gels d'après les observations macroscopiques des matrices. Tous les gels semblent présenter une porosité de quelques centaines de nanomètres. Ce dernier point concernant la porosité des gels pourra être analysé par des mesures d'adsorption-désorption d'azote que nous décrirons dans la partie suivante.

c) *Surface spécifique et porosité des gels*

L'agrégation des nanoparticules de silice conduit à la formation de pores plus ou moins importants en fonction de la concentration en silice. Afin de comprendre l'effet de l'ajout en nanoparticules d'oxyde de fer, les matrices ont été caractérisées selon une étude d'adsorption-désorption d'azote. Cette technique permet de déterminer la surface spécifique, le volume poreux, la surface poreuse, le diamètre moyen des pores et la distribution poreuse de l'échantillon. Une analyse thermogravimétrique sur des aérogels a permis au préalable d'évaluer la température pour laquelle les échantillons commencent à se dégrader. Les aérogels semblaient commencer à se décomposer à partir de 130°C, température pour laquelle le glycérol débute sa dégradation. Suite à cette observation, nous avons décidé de dégazer les aérogels à 103°C pour permettre l'évaporation d'eau physisorbée sans pour autant dégrader le glycérol. En effet, même après le séchage par point critique du CO_2, les aérogels au contact de l'air, peuvent adsorber des molécules d'eau qui vont alors couvrir la surface et remplir les pores des gels. C'est pourquoi il est indispensable de recourir à un dégazage avant d'effectuer la mesure d'adsorption-désorption d'azote. Les analyses ont été effectuées sur des aérogels de silice dans lesquels ont été ajoutées différentes concentrations en magnétite : 1,25 ; 2,5 et 5 g/l et nous ont permis de tracer les isothermes d'adsorption-désorption correspondant au volume de gaz N_2 adsorbé dans les conditions normales de température et de pression, en fonction de la pression relative d'équilibre P/P_0. Pour la température de l'analyse (77 K), P_0 correspond à la pression de vapeur saturante du gaz (N_2).

Les méthodes Brunauer-Emett-Teller (BET) et Barret-Joyner-Halenda (BJH) nous ont permis de calculer la surface spécifique des aérogels et leur distribution poreuse (Brunauer *et al.,* 1938 ; Barret *et al.,* 1951). Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote pour les différents gels sont représentées dans la figure 34. L'allure de ces isothermes donne des informations sur les caractéristiques texturales d'un matériau.

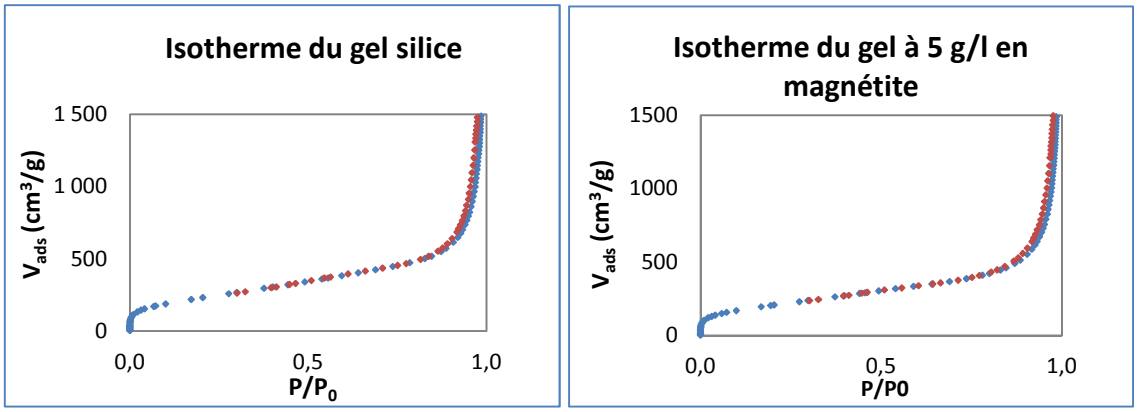


Figure 34 : Isothermes d'adsorption-désorption d'azote pour les gels de silice à 0 g/ l en magnétite (à gauche) et conçus avec une suspension à 5 g/l en magnétite (à droite)

Les isothermes obtenues pour chaque gel sont de type II correspondant à des matériaux macroporeux avec un diamètre poreux supérieur à 50 nm. La quantité de gaz adsorbé augmente progressivement en fonction de la pression relative à l'équilibre. Il s'agit d'une adsorption multimoléculaire spécifiant que la couche adsorbée sur le matériau s'épaissit progressivement. Les courbes ne présentent pas d'hystérèse caractéristique des matériaux mésoporeux dont la taille des pores est comprise entre 2 et 50 nm.

Tableau 9 : Surface spécifique et volume poreux des différents gels

Gels	Surface spécifique (a_s) m^2/g	Volume poreux (V_p) cm^3/g
Silice	835 +/- 5	2,2 +/- 0,1
Silice + magnétite (1,25 g/l)	445 +/- 5	4 +/- 0,1
Silice + magnétite (2,5 g/l)	360 +/- 5	2,1 +/- 0,1
Silice + magnétite (5 g/l)	755 +/- 5	2,2 +/- 0,1

Les résultats obtenus dans le tableau 9, montrent que la présence de nanoparticules de magnétite change la surface spécifique. Si l'on ne tient pas compte des valeurs obtenues pour le gel à 5 g/l en magnétite, on peut alors voir que plus la concentration en magnétite augmente, plus on a une diminution de la surface spécifique. Tous les aérogels présentaient une distribution du diamètre poreux compris entre 3 et 80 nm avec des diamètres moyens très variables. Les nanoparticules de magnétite de 10 nm présentent une surface spécifique moins importante que les nanoparticules de silice de 5 nm environ. Cet effet de taille pourrait donc contribuer à diminuer la surface spécifique du matériau.

d) *Propriétés magnétiques*

(1) VSM

Les gels de silice avec différentes concentrations en magnétite ont été caractérisés par VSM après avoir été préalablement séchés par point critique afin de préserver leur porosité. La figure 35 présente les courbes d'aimantation des gels réalisés avec des suspensions à 5 g/l ; 2,5 g/l et 1,25 g/l en magnétite.

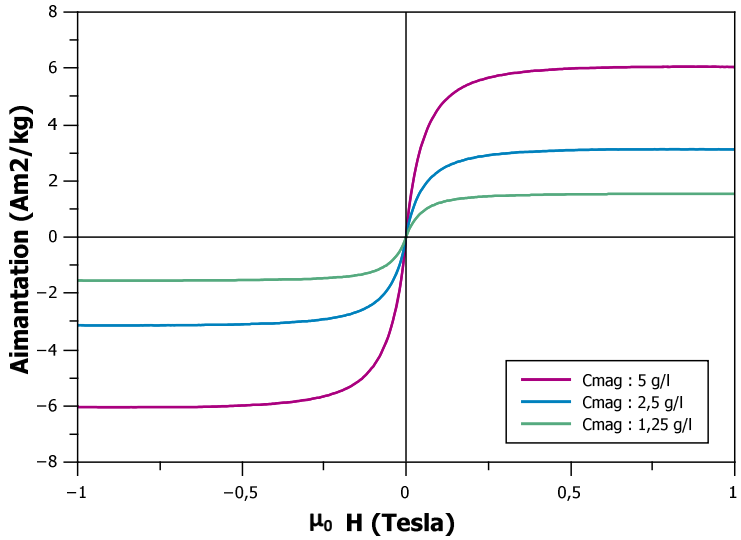


Figure 35 : Courbe d'aimantation des gels de silice conçus avec des suspensions à 1,25 ; 2,5 et 5 g/l en magnétite en fonction du champ magnétique appliqué à 300K

En raison du comportement diamagnétique de la silice et des faibles concentrations en magnétite dans les gels, l'aimantation à saturation est plus faible que celle estimée pour les poudres de magnétite.

Tableau 10 : Aimantation à saturation (Ms) et rémanente (Mr), Mr/Ms et champ coercitif (Hc) pour les différents gels

Gels	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Mr/Ms	Hc (mT)
Silice + magnétite (5 g/l)	6	0,016	3.10^{-3}	0,1
Silice + magnétite (2,5 g/l)	3	0,011	4.10^{-3}	0,2
Silice + magnétite (1,25 g/l)	1,5	0,001	7.10^{-4}	0,05

Nous pouvons remarquer une corrélation entre les valeurs d'aimantation à saturation et la quantité de magnétite dans chaque gel (tableau 10). Les courbes d'aimantation permettent de déterminer les proportions de magnétite par un calcul en tenant compte de la présence de sels et de glycérol. L'aimantation à saturation de la magnétite en poudre est de 66 Am^2/kg soit 100 %, on peut alors en déduire la fraction de magnétite présente dans le gel selon la formule suivante :

$$(Ms_{gel} * 100\ \%)/Ms_{magnétite}$$

Nous pouvons donc trouver que 9 % de la masse de gel conçu avec une suspension à 5 g/l correspond à de la magnétite selon les analyses magnétiques (pourcentage identique à la valeur théorique). Les valeurs d'aimantation à saturation (tableau 10) nous informent également que les nanoparticules de magnétite, même agrégées, sont réparties de manière homogène au sein des différents gels.

(2) SQUID

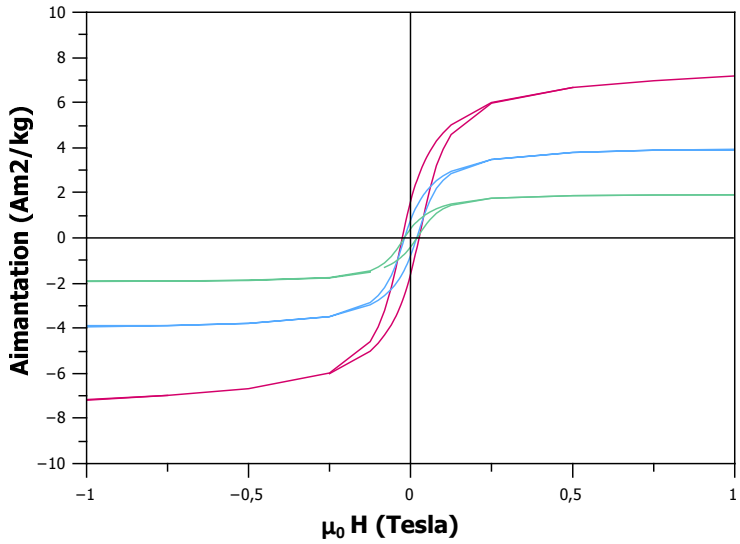


Figure 36 : Courbe d'aimantation des gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à 1,25 g/l (en vert) ; 2,5 g/l (en bleu) et 5 g/l (en rose) en fonction du champ magnétique appliqué à 10 K

D'après les courbes d'aimantation des différents gels à 10 K (Fig. 36), nous pouvons observer que l'aimantation à saturation et l'aimantation rémanente sont directement proportionnelles à la concentration en nanoparticules de magnétite. Les valeurs Ms, Mr, Mr/Ms et Hc sont représentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Aimantation à saturation (Ms) et rémanente (Mr), Mr/Ms et champ coercitif (Hc) pour les différents gels

Gels	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Mr/Ms	Hc (mT)
Silice + magnétite (5 g/l)	8	1,6	0,2	26
Silice + magnétite (2,5 g/l)	4	0,8	0,2	19
Silice + magnétite (1,25 g/l)	2	0,4	0,2	19

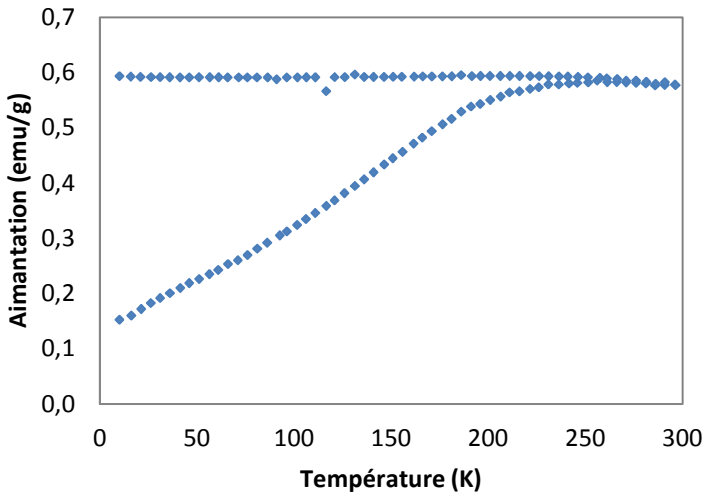


Figure 37 : Courbes FC-ZFC du gel de silice conçu avec une suspension à 5 g/l en magnétite

Les courbes FC-ZFC du gel conçu avec une suspension à 5 g/l en magnétite sont présentées dans la figure 37. Nous pouvons constater que la température de blocage se situe à 250 K. Il semblerait qu'il y ait un effet du gel sur la température de blocage de la magnétite. En effet, pour les nanoparticules non intégrées dans le gel, la température de blocage était de 230 K. Ce décalage s'explique par les interactions dipolaires des nanoparticules de magnétite à l'intérieur du gel. Ces interactions contribueraient à simuler le comportement magnétique de nanoparticules plus grosses. La température d'irréversibilité au croisement des deux courbes FC-ZFC, se trouve au-delà de 300 K.

2. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 400 nm

a) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

Les gels de silice ont été également élaborés à partir d'une suspension de magnétite de 400 nm concentrée à 5 g/l en magnétite obtenue par voie solvothermale. Comme nous pouvons voir sur les clichés MET réalisés sur des coupes de gel de 0,1 µm d'épaisseur, les nanoparticules de 400 nm s'agrègent très fortement et ont été fracturées lors de la coupe (Fig. 38).

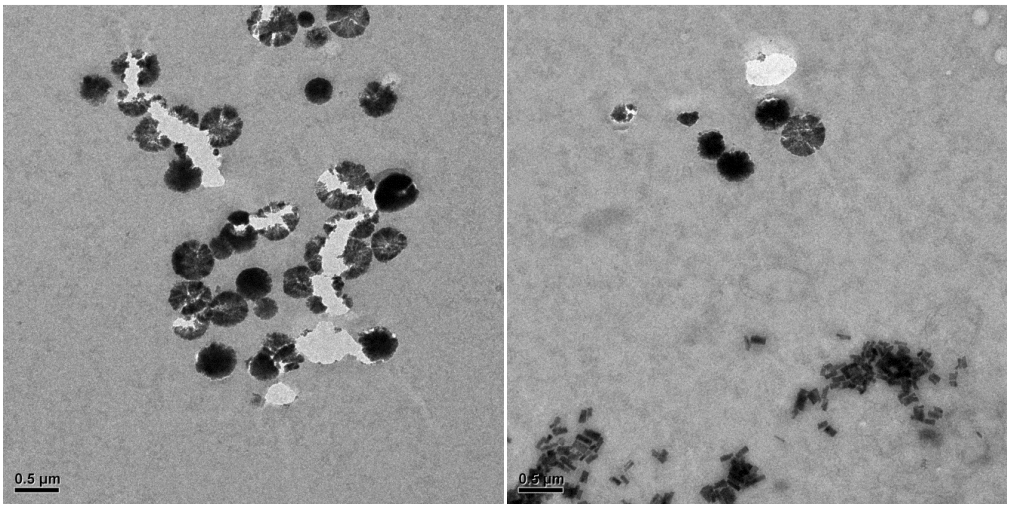


Figure 38 : Cliché MET des gels conçus à partir d'une suspension à 5 g/l en magnétite de 400 nm

Suite à l'observation par microscopie de ces gels magnétiques et des caractérisations magnétiques des poudres, nous avons décidé de ne pas utiliser ces gels pour la bioencapsulation. Etant donné que l'aimantation rémanente des poudres était très faible, il n'était pas nécessaire d'étudier la viabilité des cellules au sein de ce gel.

3. Caractérisations des gels de silice avec la magnétite de 32, 45 et 50 nm

a) *Microscopie Electronique en Transmission (MET)*

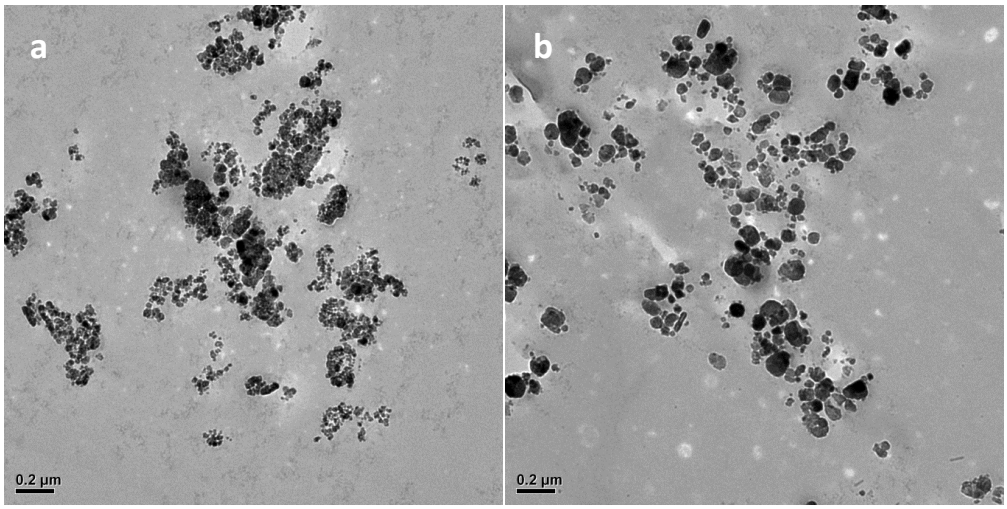


Figure 39 : Clichés MET des gels conçus avec des suspensions de magnétite à 10 g/l pour les 32 nm (a) et 5 g/l pour les 45 nm (b)

Les images MET ci-dessus présentent des coupes de gels dans lesquels ont été incorporées des nanoparticules de magnétite concentrées à 10 g/l pour les 32 nm et 5 g/l pour les 45 nm (Fig. 39). Les particules se présentent sous forme d'agrégats.

b) *Propriétés magnétiques*

(1) VSM

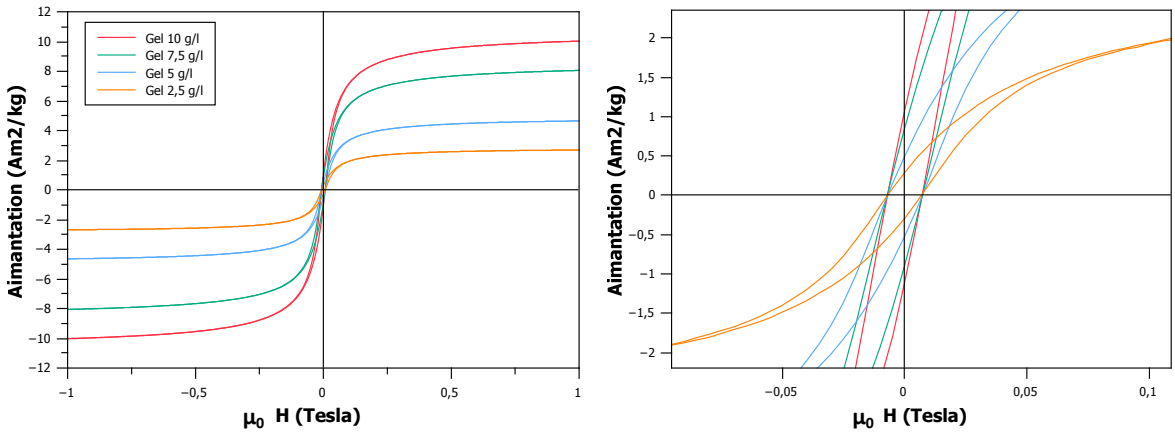


Figure 40 : Courbes d'aimantation des matrices de silice contenant différentes concentrations en nanoparticules de magnétite 32 nm à 300 K

Les courbes d'aimantation des gels conçus à partir des suspensions de magnétite à 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 g/l présentent une corrélation avec la quantité de magnétite de 32 nm (Fig. 40). En effet si l'on se réfère au tableau 12, l'aimantation à saturation est proportionnelle à la concentration en nanoparticules. L'aimantation rémanente diminue également lorsque l'aimantation à saturation diminue. Les rapports Mr/Ms et Hcr/Hc sont de 0,1 et 2 environ suggérant l'état monodomaine des particules.

Tableau 12 : Valeurs d'aimantation et de champ coercitif pour les gels de silice à différentes concentrations en magnétite de 32 nm

Gels	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Hc (mT)	Hcr (mT)
silice + 10 g/l magnétite (32 nm)	10,2	1,1	7,1	16,2
silice + 7,5 g/l magnétite (32 nm)	8,2	0,9	7,2	17,5
silice + 5 g/l magnétite (32 nm)	4,7	0,5	7,1	16,1
silice + 2,5 g/l magnétite (32 nm)	2,7	0,3	6,9	14,4

Nous pouvons remarquer que les valeurs de Hc et Hcr sont très proches de celles des poudres.

Tableau 13 : Valeurs d'aimantation et de champ coercitif pour les gels de silice à différentes concentrations en magnétite de 45 nm

Gels	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Hc (mT)	Hcr (mT)
silice + 5 g/l magnétite (45 nm)	6	1	10,9	23,4
silice + 2,5 g/l magnétite (45 nm)	3	0,5	11,3	23,1

Selon le tableau 13 représentant les différentes valeurs d'aimantation des gels contenant la magnétite de 45 nm, nous remarquons également une corrélation entre la concentration en nanoparticules et l'aimantation à saturation. Le rapport Mr/Ms est de 0,2 légèrement supérieur à celui obtenu pour les gels avec les nanoparticules de 32 nm. Les rapports Hcr/Hc s'élèvent à une valeur de 2 environ. Les valeurs de Mr/Ms et Hcr/Hc confirment donc bien que les gels contiennent des nanoparticules monodomaines. Les champs coercitifs Hc et Hcr sont très proches des valeurs obtenues pour les poudres de magnétite de 45 nm. Le gel conçu avec 5 g/l en magnétite présente une meilleure aimantation rémanente que celui possédant les nanoparticules de 32 nm pour une même concentration, ce qui confirme bien la contribution de la taille des nanoparticules sur la rémanence du gel. Il faut donc ajouter 10 g/l de magnétite de 32 nm dans le gel pour avoir la même rémanence que pour une matrice dans laquelle ont été ajoutés 5 g/l en magnétite de 45 nm.

Tableau 14 : Valeurs d'aimantation et de champ coercitif pour les gels de silice à différentes concentrations en magnétite de 50 nm

Gels	Ms (Am^2/kg)	Mr (Am^2/kg)	Hc (mT)	Hcr (mT)
silice + 5 g/l magnétite (50 nm)	6	1	11,4	22,4
silice + 2,5 g/l magnétite (50 nm)	2	0,4	11,7	22,6

Les gels avec les nanoparticules de 50 nm ont les mêmes propriétés magnétiques que les matrices obtenues avec les nanoparticules de 45 nm (Tableau 14). Les rapports Mr/Ms et Hcr/Hc sont de 0,2 et 2 environ. Par contre, l'aimantation à saturation ne varie pas exactement de manière proportionnelle avec la quantité de magnétite. Ces valeurs montrent qu'il pourrait y avoir un problème d'homogénéité et de dispersion des nanoparticules magnétique dans le gel. Toutefois, les valeurs de Hc et Hcr corroborent bien avec celles de la magnétite de 50 nm en poudre.

C. Bilan

Plusieurs protocoles de synthèse ont été élaborés pour obtenir des nanoparticules de tailles contrôlées et monodisperses. En effet, les propriétés magnétiques des nanomatériaux sont dépendantes de la taille de ceux-ci. Dans un premier temps, nous avons réalisé deux protocoles de synthèse par voie polyol et par voie solvothermale tous deux décrits dans la littérature (Basti *et al.,* 2010 ; Deng *et al.,* 2005). Puis dans un second temps, nous avons élaboré un nouveau protocole de synthèse par thermo-hydrolyse. La méthode de synthèse par voie polyol nous a permis d'obtenir des nanoparticules superparamagnétiques. Malgré l'absence d'aimantation rémanente à température ambiante, ces nanoparticules nous ont permis dans un premier temps d'élaborer le protocole de fabrication des gels magnétiques. Par la suite, les synthèses ont été réalisées par voie solvothermale afin d'obtenir des nanoparticules plus grosses (Deng *et al.,* 2005). Cependant, ces particules présentaient une certaine polydispersité et une faible aimantation rémanente. Et enfin, nous avons élaboré un nouveau protocole conduisant à des nanoparticules monodomaines avec une aimantation rémanente à température ambiante, propriété recherchée pour créer un champ interne et permanent au gel après l'application d'un champ magnétique extérieur.

Les nanoparticules de magnétite, synthétisées par voie polyol et par thermo-hydrolyse, ont été utilisées pour élaborer des gels magnétiques avec des propriétés différentes. Les matrices réalisées avec des nanoparticules de 10 nm présentaient un décalage de la température de blocage par rapport aux poudres de magnétite. Les gels possédaient des propriétés superparamagnétiques à 300 K et un comportement ferrimagnétique à 10 K avec une rémanence croissante en fonction de la concentration en magnétite. Les matrices ont ensuite été conçues avec des nanoparticules de 32, 45 et 50 nm produites par thermo-hydrolyse. Les meilleures propriétés magnétiques ont été obtenues pour les gels conçus avec une suspension à 10 g/l en magnétite de 32 nm et 5 g/l en particules de 45 et 50 nm. Pour ces différentes matrices, l'aimantation rémanente s'élevait à 1 Am^2/kg. Nous avons donc pu montrer que la taille et la concentration en nanoparticules jouaient un rôle important sur la rémanence d'un matériau.

Les analyses de la surface spécifique et de la porosité des gels ont été effectuées sur les matrices avec de la magnétite de 10 nm et nous ont permis de voir que la surface spécifique et la surface poreuse dépendaient de la concentration en magnétite. Tous les gels présentaient une macroporosité. Cette porosité importante peut s'expliquer par la diminution de la concentration en silice dans nos gels où la silice colloïdale (ludox) à 8,65 M est absente.

Etant donné que les gels ont d'abord été élaborés avec des nanoparticules de magnétite de 10 nm, nous avons donc commencé par réaliser des tests de viabilité sur les bactéries *Escherichia coli* afin de montrer que les matrices étaient cytocompatibles. Cette étude sera donc présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre III – Encapsulation des bactéries dans des matrices minérales

Chapitre III – Encapsulation des bactéries dans des matrices minérales 116

PARTIE I- ENCAPSULATION DES BACTERIES *ESCHERICHIA COLI* 116

I. Procédé d'encapsulation des bactéries *Escherichia coli* 117

A. Description des bactéries *Escherichia coli* 117

B. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées 118

C. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation 119

D. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels 120

II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices 123

A. Numération sur boîtes 124

B. Test Alamar Blue 127

C. Dosage de l'ATP 131

D. Microscopie Electronique en Transmission (MET) 136

E. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 140

F. Conclusion 141

PARTIE II- ENCAPSULATION DES BACTERIES *MAGNETOSPIRILLUM MAGNETICUM* 143

I. Procédé d'encapsulation des bactéries magnétotactiques 143

A. Description des bactéries Magnetospirillum magneticum 143

B. Choix du milieu de culture 144

C. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées 146

D. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation 147

E. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels 148

II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices 150

A. Viabilité des bactéries encapsulées sans magnétosomes 150

B. Viabilité des bactéries encapsulées avec des magnétosomes 158

C. Détection des magnétosomes par VSM 168

D. Conclusion 172

III. Bilan 173

Chapitre III : Encapsulation des bactéries dans des matrices minérales

PARTIE I- ENCAPSULATION DES BACTERIES *ESCHERICHIA COLI*

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la méthode de conception des matrices fonctionnelles à base de silice et de nanoparticules de magnétite dans des conditions cytocompatibles pour la bioencapsulation. Nous avons pu constater que les propriétés magnétiques des gels dépendaient de la taille des nanoparticules de magnétite et de leur concentration. Ainsi plus la taille et la concentration des particules magnétiques dans les gels augmentent, plus la rémanence du matériau est importante. Les protocoles de fabrication des gels magnétiques ont d'abord été conçus avec des nanoparticules de magnétite superparamagnétiques de 10 nm. En effet, les nouveaux protocoles de synthèse de particules monodomaines stables ont été obtenus très tardivement au cours de ce travail de thèse. Nous avons donc dans un premier temps testé la cytocompatibilité des matrices dans lesquelles étaient incorporées des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm. Afin de déterminer l'effet des particules magnétiques sur les bactéries encapsulées, des matrices de silice ont été réalisées. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet d'un champ magnétique statique sur les bactéries immobilisées dans les matrices de silice.

L'étude de la viabilité des cellules dans ces différents types de matériaux (gel de silice à base de magnétite de 10 nm, gel de silice avec et sans champ externe) a d'abord été réalisée avec des bactéries modèles *Escherichia coli*. Ainsi, le nombre de cellules vivantes dans les gels a été déterminé au cours du temps: directement après l'encapsulation au bout de 15 min (t=0) et après 1, 7 et 15 jours d'immobilisation à 20°C. Les observations en microscopie électronique des différents gels ont permis de déterminer l'état de dispersion des cellules au sein des matrices et si l'intégrité membranaire était préservée suite à l'encapsulation.

Dans ce chapitre, nous verrons dans un premier temps le mode opératoire pour la bioencapsulation puis dans un second temps le suivi de la viabilité des cellules dans les gels au cours du temps.

I. Procédé d'encapsulation des bactéries *Escherichia coli*

A. Description des bactéries *Escherichia coli*

Les bactéries *Escherichia coli* sont très largement utilisées en laboratoire en tant qu'outils pour le clonage, pour la production de protéines d'intérêt mais également pour les études de toxicité. Cet organisme modèle permet également une meilleure compréhension des microorganismes en général. Le génome d'*Escherichia coli* est entièrement séquencé, ce qui en fait une bactérie de choix pour les études aussi bien dans la recherche fondamentale que pour le développement industriel (biotechnologie).

En ce qui concerne les études sur les bioencapsulations, l'organisme le plus couramment utilisé reste la bactérie *Escherichia coli* pour évaluer la cytocompatibilité des matrices à base d'oxydes métalliques (Nassif *et al.,* 2002 ; Amoura *et al.,* 2007; Perullini *et al.,* 2011).

Escherichia coli ou colibacille fait partie de la famille des Enterobacteriaceae et vit à l'intérieur des intestins chez les mammifères et l'Homme. Elle possède une forme de bâtonnet de 2 µm de longueur et 0,4 µm de largeur environ. Cet organisme procaryote ne possède pas de noyau pour contenir l'appareil génétique et se multiplie par division cellulaire. On parle alors de reproduction assexuée. *Escherichia coli* est une bactérie gram négatif c'est à dire qu'elle comporte une paroi pauvre en peptidoglycanes (polysaccharides et peptides). Son enveloppe est ainsi constituée en trois parties : une membrane externe, un espace périplasmique et une membrane plasmique. Le mouvement des bactéries est assuré par la présence de flagelles qui permettent ainsi la chimiotaxie. Les bactéries vont alors pouvoir se déplacer en fonction de gradients chimiques dans leur milieu. Une des caractéristiques de ces bactéries réside dans leur capacité à se multiplier très rapidement. Lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu riche en nutriments en aérobie à une température optimale de croissance de 37°C, elles peuvent se diviser en 20 min. La préparation des cultures est donc très rapide contrairement à d'autres microorganismes comme par exemple les bactéries magnétotactiques. *Escherichia coli* est un microorganisme dit chimioorganotrophe c'est à dire qu'il produit son énergie (ATP) à partir de l'oxydation des molécules organiques. Lors de la respiration aérobie, le dioxygène va alors jouer le rôle d'accepteur final d'électrons pour permettre la production d'énergie.

B. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées

La souche CIP 54125 que nous avons utilisée lors de nos expériences provient de la collection de l'Institut Pasteur. La croissance des bactéries en général se déroule en trois temps : une phase de latence où les bactéries commencent à s'adapter à leur milieu, suivie d'une phase exponentielle de croissance et d'une phase stationnaire. Lors de la phase exponentielle de croissance, les bactéries sont toutes dans le même état physiologique. Elles peuvent ainsi mieux résister au stress. En phase stationnaire, les microorganismes subissent un stress lié à l'appauvrissement du milieu de culture et ne vont donc plus se diviser. Comme les bactéries se trouvent dans le même état physiologique et sont plus résistantes au stress lorsqu'elles sont en phase exponentielle, il était donc préférable de les encapsuler à ce stade conformément aux études antérieures réalisées par Nassif *et al.,* 2002. Les bactéries sont d'abord cultivées dans un milieu Luria Bertani (LB) puis repiquées dans un milieu pauvre appelé milieu minimum phosphate en condition aérobie à 37° C (cf. Annexe 9). Les bactéries sont transférées dans un milieu moins riche afin de les habituer préalablement au stress lié à l'encapsulation où elles seront privées de nourriture. Quelques explications à ce sujet seront données dans la partie suivante. La culture en milieu minimum glucose est arrêtée à une Densité Optique (DO) de 0,2 voire 0,3 au bout de 3h30 ou 4h d'incubation en fonction de la quantité de bactéries désirée pour la réalisation des expériences (Fig. 1).

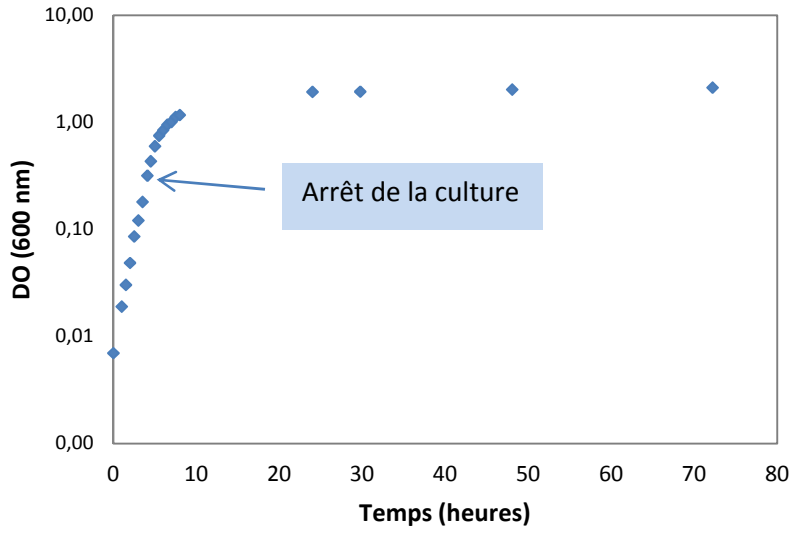


Figure 1 : Courbe de croissance des bactéries *E.coli* cultivées dans un milieu minimum glucose à 37°C sous agitation

C. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation

Les bactéries en phase exponentielle sont centrifugées et lavées trois fois dans du tampon phosphate (cf. Annexe 10). Pour la préparation des suspensions bactériennes, le culot bactérien est resuspendu dans du tampon phosphate supplémenté de 10 % de glycérol. L'ajout d'un cryoprotectant tel que le glycérol permet de préserver les cellules contre le stress lié à l'encapsulation. Il permet notamment de protéger les bactéries du contact avec les groupements silanol présents dans la silice et il joue le rôle d'osmoprotecteur en évitant le stress osmotique lié à la présence de sels dans les gels (Nassif *et al.,* 2002 ; Perullini *et al.,* 2011). Les suspensions sont préparées de manière à obtenir une DO de 2,5 correspondant à une concentration de 10^9 bactéries/ml. Le protocole de fabrication des gels se réalise de la même manière que celui utilisé au chapitre 2 pour obtenir des matrices magnétiques composées de nanoparticules de magnétite de 10 nm et des matrices non magnétiques constituées seulement de silice. Les bactéries dans le tampon phosphate 10 % glycérol sont alors ajoutées juste après l'acidification du mélange précurseur-nanoparticules de magnétite (gels magnétiques) ou précurseur-eau (gels de silice). Le procédé de bioencapsulation est décrit dans la figure 2.

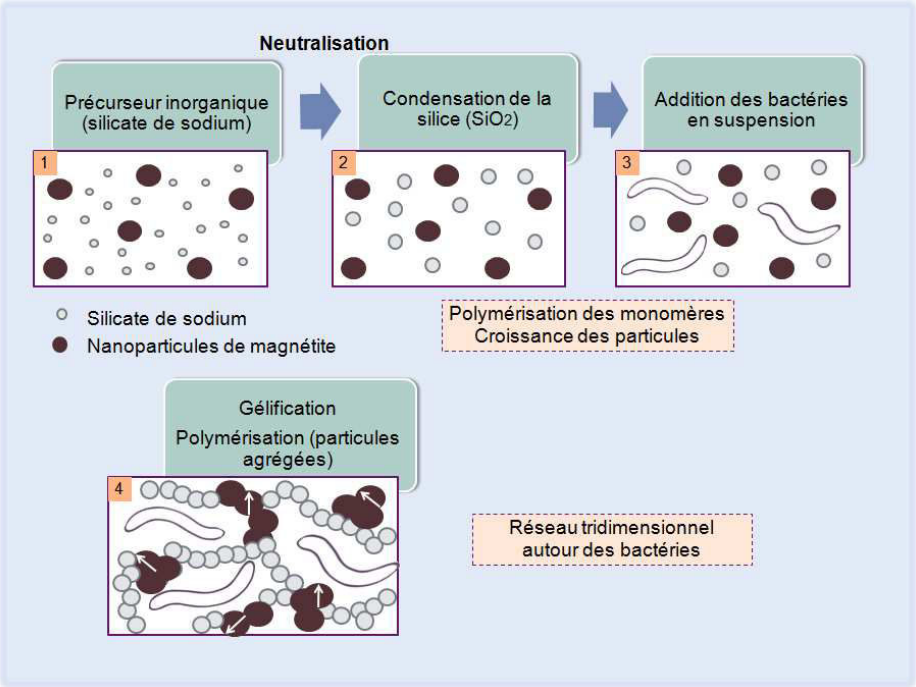


Figure 2 : Principe de la bioencapsulation dans une matrice magnétique

La neutralisation du précurseur de silice en présence ou en absence de nanoparticules de magnétite conduit à la condensation de la silice qui va s'ensuite s'agréger et former un réseau tridimensionnel autour des bactéries. Pour les gels magnétiques, les agrégats de nanoparticules de magnétite sont dispersés dans la silice. La formation du réseau de silice tout autour des bactéries

permet de disperser les cellules en évitant leur sédimentation et leur communication par l'intermédiaire de signaux chimiques appelés « quorum sensing » (Miller & Bassler, 2001). En effet, les bactéries en général peuvent utiliser ces signaux dans certains processus physiologiques tels que la virulence, la mobilité et la formation de biofilms par exemple. Théoriquement, les bactéries piégées ne peuvent ni se déplacer ni se diviser dans un espace confiné. En raison du manque d'espace suffisant pour pouvoir se diviser, les bactéries sont encapsulées sans nutriments pour bloquer le cycle cellulaire. En effet, les cellules en division pourraient subir un stress mécanique ce qui pourrait conduire à une mort anticipée à cause du confinement dans le matériau. Cette hypothèse avait été suggérée lors des précédents travaux réalisés sur des gels de silice mésoporeux conçus avec 1 ml de silicate de sodium à 0,4 M et 1 ml de silice colloïdale à 8,5 M (Nassif *et al.,* 2002).

D. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour étudier la viabilité des bactéries. Parmi celles qui permettent une numération directe des cellules, on retrouve la cytométrie de flux, le comptage sur boîtes de Pétri ou au microscope optique. D'autres méthodes permettent d'évaluer l'activité métabolique des cellules comme par exemple le suivi de l'incorporation du glucose, l'activité respiratoire et la production d'ATP.

Au cours de nos expériences, nous avons décidé d'utiliser trois techniques : le comptage sur boîtes de Pétri, le suivi de l'activité respiratoire par la technique Alamar Blue et l'ATP-métrie (dosage d'ATP). Pour évaluer la viabilité des bactéries encapsulées, il est nécessaire de casser le gel, de le resuspendre dans 5 ml de tampon phosphate et de placer le gel resuspendu sous agitation magnétique pour permettre l'extraction des cellules piégées dans la matrice.

Nous avons choisi d'effectuer une numération sur boîte de Pétri car elle permet de déterminer le nombre de bactéries viables cultivables. Les bactéries extraites du gel resuspendu sont diluées en série dans du tampon phosphate avant d'être étalées sur un milieu de culture riche supplémenté d'agar (LBA). Les bactéries vont alors se diviser et former des colonies sur le milieu de culture solide après une incubation de 24h à 37°C. Une colonie correspond à une unité formatrice de colonies (ufc) c'est à dire une bactérie à l'origine. Le nombre de colonies comptées sur boîtes est reporté en CFU/ml (colony forming unit par ml). Malgré la simplicité de cette méthode, celle-ci présente des limites car elle ne permet pas de comptabiliser les bactéries viables non cultivables, ce qui peut donc sous-estimer le nombre exact de cellules viables dans le gel (Oliver J. D., 2005). De plus, cette méthode nécessite une bonne redispersion du gel car si les bactéries restent piégées dans des agrégats de gel, celles-ci ne pourront pas se diviser sur boîte de Pétri et le nombre de cellules

sera également sous-estimé. Afin de s'affranchir des problèmes liés aux bactéries viables non cultivables et des problèmes liés à la redispersion des gels, nous avons utilisé la méthode Alamar Blue. Le test Alamar Blue est très largement employé pour la quantification des cellules eucaryotes et procaryotes et le suivi de la viabilité. Ce test peut être mis en place dans de nombreuses applications comme la détection des contaminations microbiologiques du lait (Bigalke D. L., 1984), la détection des microorganismes dans les études de bioremédiation dans les sols (Guerin *et al.,* 2001), le suivi de la prolifération des cellules de mammifères, dans la cytotoxicité (O'Brien *et al.,* 2000 ; Rasmussen E. S., 1999) ainsi que dans la détermination de l'activité respiratoire microbiologique dans les boues activées (McNicholl *et al.,* 2007).

Pour la réalisation des tests Alamar Blue, les bactéries extraites du gel sont diluées en série dans du tampon phosphate puis mises en contact avec un colorant, la résazurine de couleur bleue lorsqu'elle est oxydée (cf. Annexe 12). La résazurine va alors rentrer dans le cytosol des cellules et va se réduire en résorufine (de couleur rose fluorescente) au niveau de la chaine respiratoire (Fig. 3 et 4). Après un temps d'incubation prolongé, la résorufine se transforme en un produit incolore appelé dihydrorésorufine. La résazurine va jouer le rôle d'accepteur d'électrons intermédiaire dans la chaine de transport sans interférer avec le transfert normal d'électrons (Page *et al.,* 1993). Le colorant sous forme oxydée peut être réduit par les coenzymes (ex : NADH) et les cytochromes oxydases de la chaine respiratoire. Contrairement au test de viabilité MTT (à partir de sels de tetrazolium), l'Alamar Blue n'est pas toxique pour les cellules et peut être réduit par les cytochromes, ce qui conduit à une plus grande sensibilité et reproductibilité dans la détection de cellules en faible concentration (Nociari *et al.,* 1998).

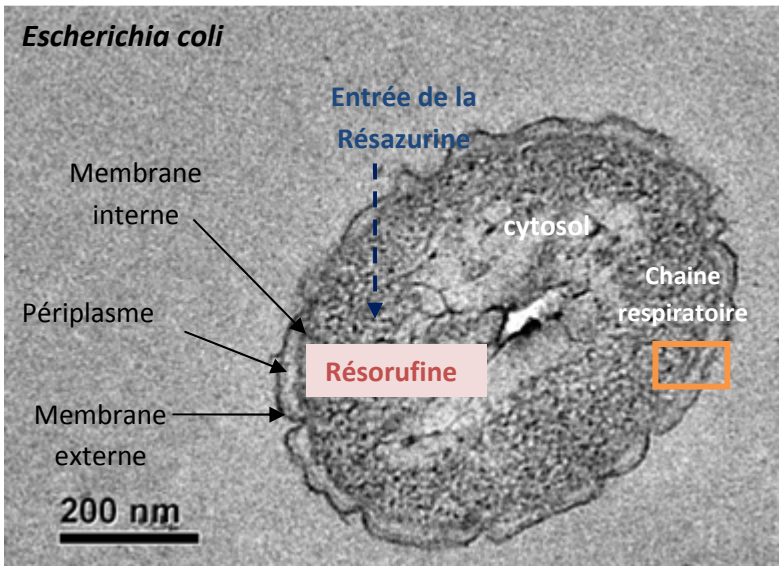


Figure 3 : Bactérie *Escherichia coli* en contact avec la résazurine

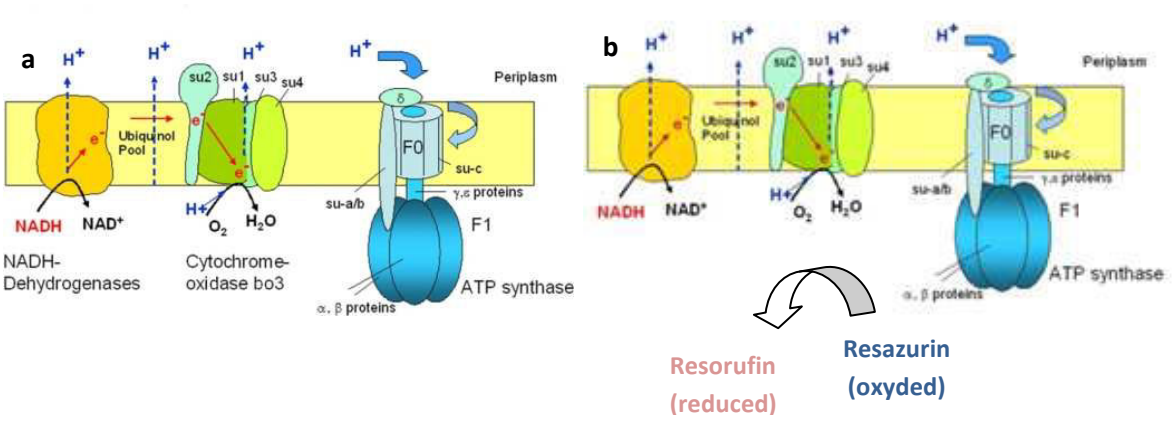


Figure 4 : Chaine respiratoire chez les bactéries *E.coli* en absence de résazurine (a) et en présence de résazurine (b) (source : Dalbey & Kuhn, 2004)

Le pourcentage de réduction de l'Amar Blue peut être directement corrélé au nombre de bactéries viables (métaboliquement actives) et se détermine par une mesure d'absorbance de l'Alamar Blue réduit et oxydé présents dans le milieu (cf. Annexe 12). La sensibilité de cette technique dépend à la fois du nombre de cellules en solution et du temps d'incubation. Cette méthode est plus rapide que le comptage sur boîtes et se déroule entre 2 et 4h au lieu de 24h pour la numération sur boîtes.

En parallèle, nous avons utilisé une autre méthode nommée ATP-métrie qui consiste à doser l'ATP produit par les cellules au cours de la respiration. L'ATP (Adenosine Triphosphate) permet d'estimer facilement la biomasse microbiologique car cette source d'énergie est présente dans toutes les cellules vivantes et le taux d'ATP par cellule reste relativement constant (Ishida *et al.,* 2002). Cette technique est très largement utilisée pour la quantification du nombre de cellules vivantes, la prolifération des cellules et dans les études de cytotoxicité (Kangas *et al.,* 1984 ; Crouch *et al.,* 1993). L'ATP-métrie nécessite une destruction cellulaire pour permettre la libération de l'ATP. Ainsi l'énergie extraite peut être quantifiée de manière simple au moyen d'une enzyme, la luciférase et d'un substrat, la luciférine. En présence d'ATP, il se produit alors la réaction suivante :

$$\underset{\textit{(Substrat)}}{(\text{Luciférine} + \text{ATP} + Mg^{2+})} + \underset{\textit{(Enzyme)}}{(\text{Luciférase} + O_2)} \text{ ----> } \underset{\textit{(Produit)}}{(\text{Oxyluciférine} + \text{Photons})} + \text{Luciférase} + \text{AMP} + \text{Pi}$$

La quantité de photons émis lors de la réaction est directement mesurée au moyen d'un luminomètre. L'intensité lumineuse émise est proportionnelle à la concentration d'ATP dans la solution.

Par la suite nous verrons que ces techniques se sont révélées très utiles pour les bactéries magnétotactiques.

II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices

L'effet du champ magnétique sur les cellules est une thématique très largement étudiée et suscite encore aujourd'hui beaucoup d'interrogations. Les *Escherichia coli* ont été encapsulées dans des matrices magnétiques à base de silice et de nanoparticules de magnétite de 10 nm dans un premier temps. Bien que ces particules ne permettent pas d'obtenir un matériau avec une rémanence, il était tout de même important de tester la cytocompatibilité de ceux-ci à différentes concentrations en nanoparticules magnétiques. En parallèle, des matrices non magnétiques à base de silice ont été conçues pour les bioencapsulations. Ces gels serviront de contrôle pour permettre de dissocier l'effet de l'encapsulation et l'effet lié aux particules superparamagnétiques. Afin que la recherche d'un nouveau protocole de synthèse de particules magnétiques monodomaines ne constitue pas un frein pour les études de viabilité en présence d'un champ magnétique, nous avons donc décidé de substituer les particules magnétiques par des gros aimants externes placés de part et d'autre des gels. Ce nouveau procédé présente un grand avantage car il permet de créer un champ homogène statique et à priori plus fort que celui créé par des nanoparticules magnétiques intégrées dans la silice. Afin d'étudier l'influence du champ magnétique sur les bactéries, des gels de silice ont été exposés à un champ modéré de 80 mT.

Les tests de viabilité sur les *Escherichia coli* encapsulées ont été réalisés sur 15 jours avec un suivi directement après l'encapsulation à t=0 (15 min) puis au bout de 1, 7 et 15 jours. Le nombre de bactéries viables dans les suspensions bactériennes avant l'encapsulation a été pris comme référence (100 %). Nous verrons dans un premier temps l'étude de la viabilité des cellules par la méthode de comptage sur boîtes puis par la technique de réduction du colorant (Alamar Blue) et enfin le dosage d'ATP par bioluminescence. Dans un second temps, nous observerons les bactéries piégées dans les matrices par microscopies MET et MEB.

A. Numération sur boîtes

1. Effet de la concentration en nanoparticules de magnétite de 10 nm sur les bactéries encapsulées

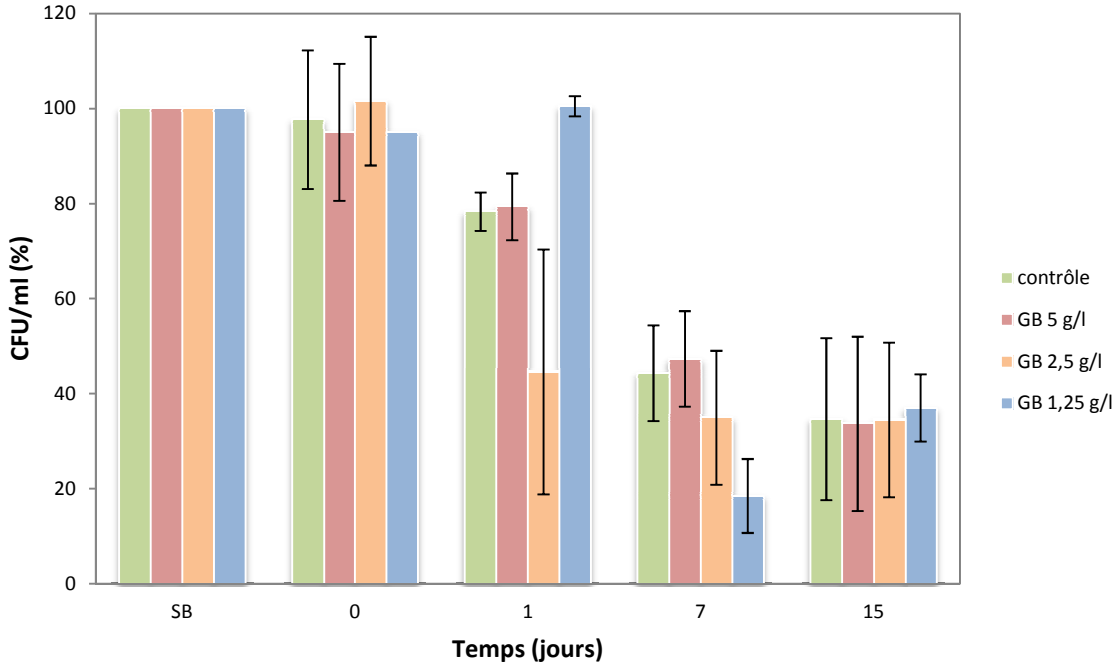


Figure 5 : Viabilité des cellules encapsulées dans des gels de silice (en vert) et des gels conçus avec une suspension de magnétite à 1,25 g/l (en bleu) ; 2,5 g/l (en orange) et 5 g/l (en rouge), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation. SB : suspension bactérienne. GB : gel bactérien.

La viabilité des bactéries au sein des gels est déterminée en pourcentage de CFU/ml au cours du temps dans les différentes matrices non magnétiques et dans des gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à différentes concentrations : 1,25 ; 2,5 et 5 g/l (Fig. 5). La référence à 100 % correspond au nombre de CFU/ml dans la suspension bactérienne (SB) avant encapsulation. Etant donné que la synthèse de nanoparticules de magnétite par voie polyol permet d'obtenir des concentrations en particules comprises entre 14 et 28 g/l dans un volume de 25 ml, nous avons fait le choix de travailler avec des concentrations n'excédant pas les 5 g/l. Ainsi les expériences ont toutes été réalisées avec la même suspension de nanoparticules. De plus pour des concentrations de 5 g/l en magnétite, les gels sont bien homogènes avec des agrégats de nanoparticules de magnétite bien dispersés.

Nous pouvons constater que directement après l'encapsulation à t=0, les bactéries ne semblent pas stressées dans les différents gels et la viabilité avoisine les 100 %. Après 1 jour, le nombre de bactéries viables diminue à 80 % environ pour les gels de silice (contrôle) et les gels à 5 g/l

en magnétite. Les résultats obtenus pour les matrices à 2,5 g/l et 1,25 g/l sont totalement différents avec des taux de bactéries viables à 45 % (+/- 26 %) et 101 % (+/- 2%) et suggèrent des problèmes de reproductibilité de la mesure. Au bout de 7 jours d'encapsulation, nous pouvons constater une diminution de la viabilité des bactéries qui passe à 44 et 47 % pour les gels contrôles et à base de magnétite à 5 g/l tandis que les gels à 2,5 g/l et 1,25 g/l contiennent 35 et 19 % de cellules vivantes. Enfin à 15 jours d'encapsulation, quelque soit le type de gel, le nombre de bactéries viables est compris entre 34 et 37 % malgré les écarts types importants (entre 7 et 18 %). Entre 7 et 15 jours, les bactéries subissent un stress au cours du vieillissement des gels. Les gels de silice ont la particularité d'évoluer dans le temps et se contractent au cours du vieillissement (synérèse). Ce processus peut conduire à des problèmes de redispersion des gels au bout de 15 jours, ce qui pourrait donc expliquer les problèmes de reproductibilité. Les bactéries restant piégées dans les agrégats de gel ne peuvent donc pas se diviser sur les boites de Pétri. Suite à ces observations, nous avons décidé de voir si le volume de tampon phosphate utilisé lors de la resuspension des gels, pouvait améliorer l'extraction des cellules et dans ce cas influencer le nombre de bactéries comptabilisées sur boîtes de Pétri.

Les gels conçus avec une suspension de magnétite à 2,5 g/l ont alors été resuspendus dans différents volumes de tampon phosphate : 5 ml ; 10 ml ; 20 ml et 50 ml. Nous pouvons ainsi déterminer s'il y a une corrélation entre la dilution des gels et le nombre de bactéries viables cultivables et donc voir si le nombre de cellules augmente lorsque les gels sont resuspendus dans de plus grands volumes.

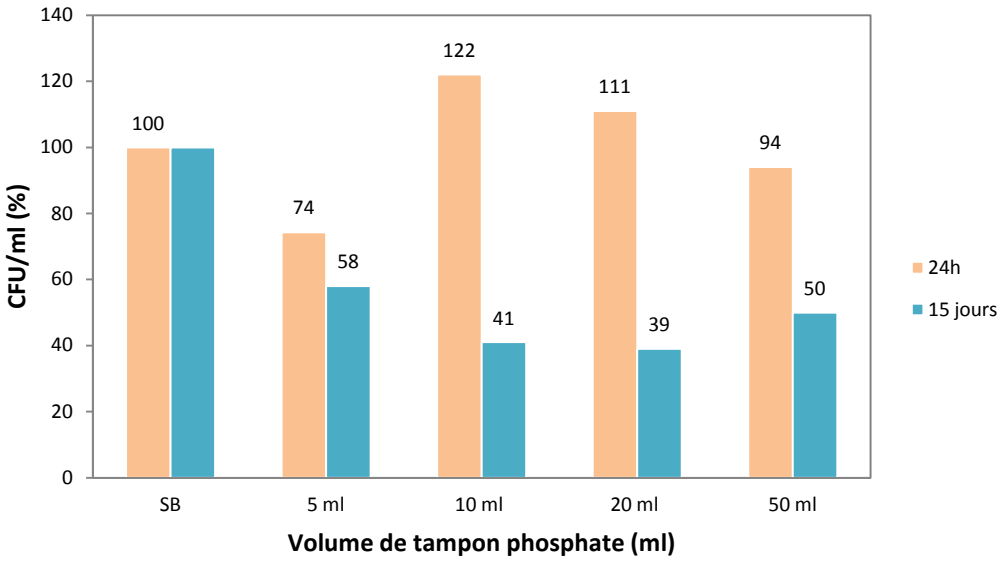


Figure 6 : Viabilité des bactéries encapsulées et resuspendues dans différents volumes de tampon phosphate après 24h (en orange) et 15 jours d'encapsulation (en bleu) (expérience réalisée une fois)

Le nombre de bactéries viables cultivables a été déterminé au bout de 24 h (en orange) et 15 jours (en bleu) en fonction du volume de tampon phosphate servant pour la redispersion (représenté en abscisse) (Fig. 6). La référence à 100 % correspond à la suspension bactérienne (SB) avant l'encapsulation. Nous pouvons constater qu'au bout de 24 h, le nombre de bactéries n'augmente pas de manière croissante avec le volume de tampon. Au bout de 15 jours, les résultats sont tout autant variables et ne dépendent pas du volume de tampon utilisé. Nous pouvons donc observer qu'un volume plus important de tampon n'améliore pas la redispersion des cellules. Quel que soit le volume de tampon, les problèmes de redispersions sont toujours présents, ce qui peut donc amplifier les problèmes de reproductibilité.

Suite à ces observations, nous avons décidé de poursuivre les expériences avec des gels préparés à partir d'une suspension de magnétite à 5 g/l. En effet, la viabilité des bactéries au sein de ces gels est identique à celle dans les gels de silice (contrôle). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'effet significatif des particules superparamagnétiques sur la viabilité des cellules encapsulées. De plus, nous avons pu voir dans le chapitre précédent, que les gels conçus avec une suspension à 5 g/l de magnétite présentent une meilleure aimantation à saturation et rémanente, ce qui leur confère de meilleures propriétés magnétiques à 10 K. Ceci nous a conforté dans notre choix de poursuivre nos expériences avec ce type de gel.

2. Effet des particules de magnétite de 400 nm sur les bactéries encapsulées

Afin de comprendre l'effet de la taille des nanoparticules de magnétite sur les bactéries encapsulées, nous avons préparé des gels avec des particules de 400 nm que nous avons ensuite comparés aux gels de silice avec ou sans nanoparticules de 10 nm.

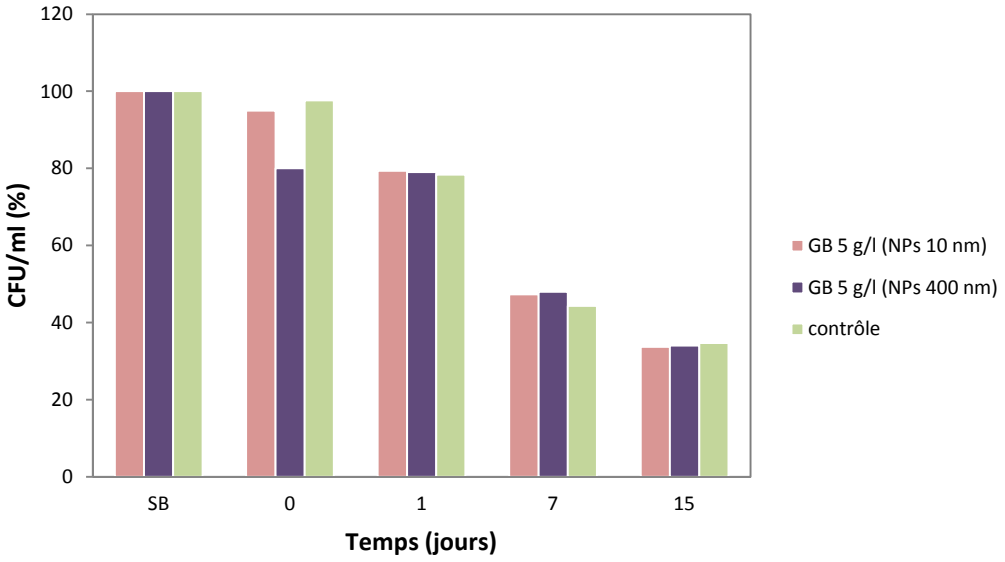


Figure 7 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice contrôle (en vert) et les matrices conçues avec 5 g/l en magnétite de 10 nm (en rose) et 400 nm (en violet), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation (écarts-types inférieurs à 20 %)

Le nombre de bactéries viables cultivables est déterminé en fonction de la référence à 100 % correspondant à la concentration en cellules dans la suspension initiale avant l'encapsulation. Nous pouvons remarquer une corrélation entre les trois gels à base de silice (contrôle), à base de magnétite de 10 nm et de 400 nm (Fig. 7). Quelle que soit la taille des nanoparticules d'oxyde de fer, la viabilité des bactéries dans les gels reste identique au cours du temps. Ce phénomène pourrait être lié à l'agrégation des nanoparticules de magnétite au sein des gels.

B. Test Alamar Blue

Nous avons pu montrer précédemment que la concentration et la taille des nanoparticules de magnétite n'influençaient pas la viabilité des bactéries encapsulées. Etant donné que les gels ne présentent pas de rémanence à température ambiante et ne peuvent donc pas créer de champ suffisamment important pour pouvoir en voir l'effet sur les bactéries, nous avons décidé de poursuivre les tests de viabilité sur des bactéries encapsulées dans des gels de silice en présence et en absence d'un champ magnétique statique de 80 mT. Il s'agit d'un champ modéré (compris entre 10^{-3} et 1 T). La force du champ a été prédéfinie par le dispositif suivant l'espacement entre les deux aimants (cf. Annexe 11). Des études ont montré qu'un champ magnétique statique de 100 mT n'affectait pas la viabilité des bactéries *E.coli* (Potenza *et al.,* 2004 ; Kohno *et al.,* 2000). Afin d'étudier les phénomènes de biominéralisation sur les bactéries magnétotactiques, il était donc plus judicieux de travailler avec des champs modérés et non des champs forts (supérieurs à 1 T) pour éviter un stress trop important qui pourrait avoir des effets négatifs aussi bien sur la viabilité des cellules que

sur la production des magnétosomes. L'utilisation d'une nouvelle méthode par réduction de la résazurine (test Alamar Blue) a été choisie pour limiter les problèmes de comptages de bactéries suite à une mauvaise redispersion des gels ou bien de la présence de bactéries stressées rentrant dans un état viable non cultivable. Le colorant va donc diffuser vers les bactéries piégées dans les agrégats de gel mal redispersés et de ce fait cette technique permet de comptabiliser toutes les cellules viables.

L'effet du champ magnétique a été suivi sur des bactéries encapsulées dans la silice pendant 0, 1, 7 et 15 jours. Les tests de viabilité ont été réalisés au moyen du comptage sur boîtes et par mesures d'absorbance de l'Alamar Blue réduit et oxydé en présence des cellules. En effet, la validation de la méthode Alamar Blue nécessite de pouvoir corréler le nombre de bactéries avec le pourcentage de réduction du colorant afin d'établir une droite standard (cf. Annexe 12). Cette droite standard présente un outil important pour la quantification des bactéries en général et permettra par la suite de suivre le nombre de cellules sans avoir recours au comptage sur boîtes qui présente quelques artéfacts lorsque l'on est confronté à des bactéries viables non cultivables.

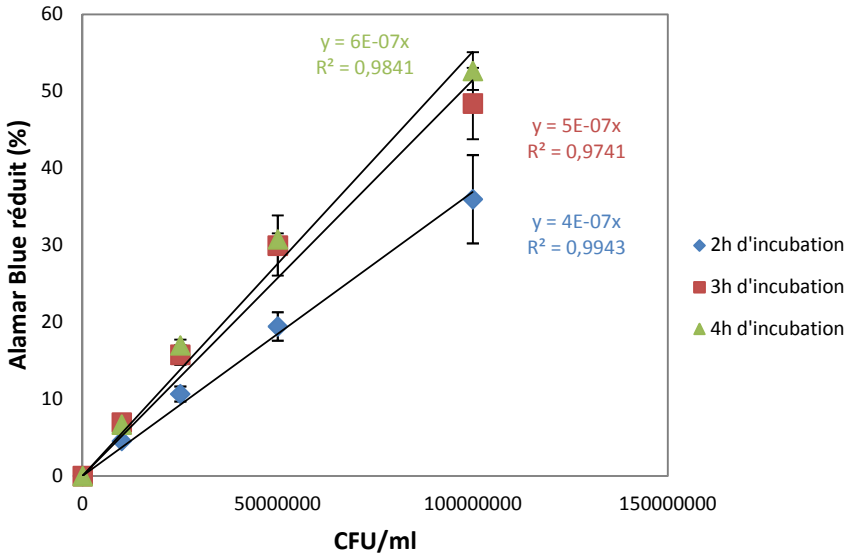


Figure 8 : Courbes standards du pourcentage d'Alamar Blue réduit en fonction du nombre de CFU/ml pour un temps d'incubation de 2h (en bleu), 3h (en rouge) et 4h (en vert)

Dans un premier temps, le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue a été déterminé sur des bactéries en suspension dans du tampon phosphate en fonction du temps d'incubation (2, 3 et 4h) (Fig. 8). Les bactéries sont diluées en série au ½ dans du tampon phosphate puis incubées à 30°C. L'absence de nutriments dans le milieu permet d'éviter la division cellulaire et donc de quantifier exactement le nombre de bactéries qui étaient présentes dans les suspensions initiales. La détermination du pourcentage de réduction de l'Alamar Blue pour chaque dilution se réalise par une mesure de DO à 570 nm pour le colorant réduit et à 600 nm pour le colorant oxydé. En parallèle, les

bactéries sont étalées sur boîtes de Pétri afin de déterminer le nombre de CFU/ml. En corrélant le nombre de CFU/ml au pourcentage de réduction de la résazurine, il est donc possible de tracer des droites standards et de déterminer les équations correspondantes pour chaque temps d'incubation. Nous avons pu remarquer que plus le temps d'incubation augmente, plus la pente est importante, ce qui permet ainsi une meilleure quantification des cellules pour des temps d'incubations plus long.

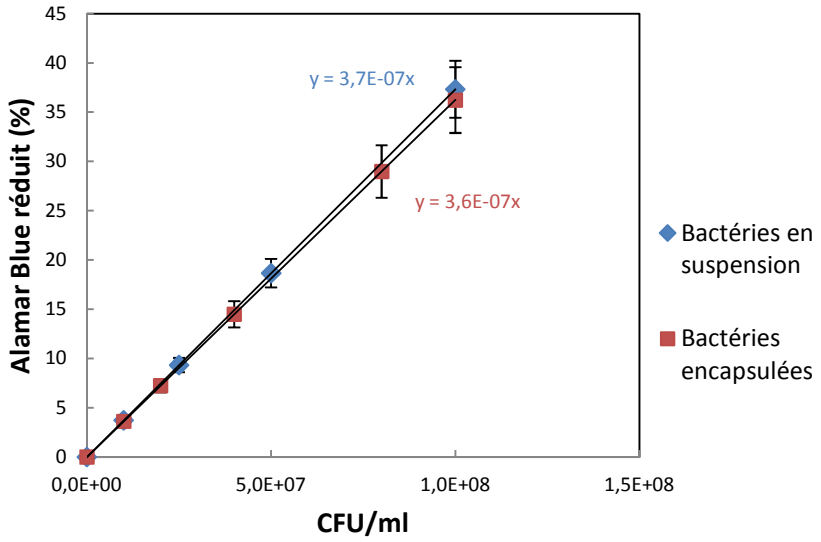


Figure 9 : Courbes standards des bactéries en suspension avant l'encapsulation (en bleu) et des bactéries dans les gels resuspendus (en rouge)

Afin de voir l'effet de l'immobilisation des cellules dans les gels sur l'activité métabolique, le pourcentage d'Alamar Blue réduit a été corrélé au nombre de CFU/ml pour des bactéries en suspension avant l'encapsulation (en bleu) et des bactéries extraites des gels resuspendus (en rouge) (Fig. 9). Les bactéries ont alors été diluées en série dans du tampon phosphate et incubées pendant 2h à 30°C en présence de résazurine. Des droites de corrélations entre le pourcentage de réduction du colorant et le nombre de CFU/ml ont donc pu ainsi être tracées. Chaque expérience a été réalisée trois fois au minimum. Pour les bactéries extraites des gels, une moyenne a d'abord été réalisée sur les gels à un temps d'encapsulation précis (à 0, 1, 7 et 15 jours). Les équations de droite moyenne à ces différents temps étaient de $3,9*10^{-7}x$ (t = 0), $3,2*10^{-7}x$ (t = 1 jour), $3,9*10^{-7}x$ (t = 7 jours) et $3,5*10^{-7}x$ (t = 15 jours). Etant donné que ces équations de droites étaient très proches, nous avons donc fait une moyenne de tous les gels à tous temps d'encapsulation confondus. En effet, même après 7 et 15 jours d'encapsulation, l'activité métabolique des cellules reste très proche de celle des cellules non encapsulées. Les variations sont donc probablement liées aux comptages des cellules sur boîtes qui dépendent fortement de la redispersion complète des cellules. La droite de corrélation moyenne standard obtenue pour tous les gels confondus est représentée (en rouge) dans la figure 9. Nous pouvons remarquer que l'équation de cette droite ($3,6*10^{-7}x$) est très proche de celle de la

suspension bactérienne avant encapsulation ($3,7*10^{-7}x$). Nous pouvons donc constater que l'activité respiratoire des cellules est préservée après immobilisation dans les gels.

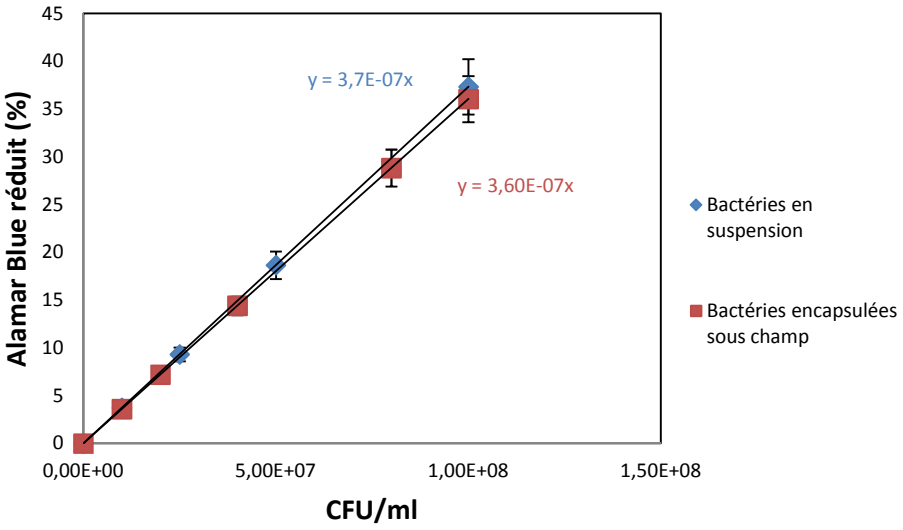


Figure 10 : Courbes standards des bactéries en suspension avant l'encapsulation (en bleu) et des bactéries dans les gels resuspendus après exposition au champ magnétique (en rouge)

La même expérience a été réalisée sur des bactéries encapsulées dans la silice en présence d'un champ magnétique statique (Fig. 10). Nous pouvons constater que l'activité respiratoire des bactéries exposées au champ (en rouge) est très proche de celles des cellules en suspension (en bleu) et identique aux cellules encapsulées en absence d'un champ magnétique (Fig. 9). Nous pouvons alors constater que l'activité métabolique est préservée pour les bactéries encapsulées en présence et en absence d'un champ. Ni l'immobilisation des cellules ni le champ magnétique affectent l'activité respiratoire. Ces observations nous permettent donc de valider la méthode Alamar Blue sur des bactéries encapsulées dans les différentes matrices. Il est alors possible d'utiliser la droite de corrélation pour déterminer le nombre de cellules viables par la méthode Alamar Blue.

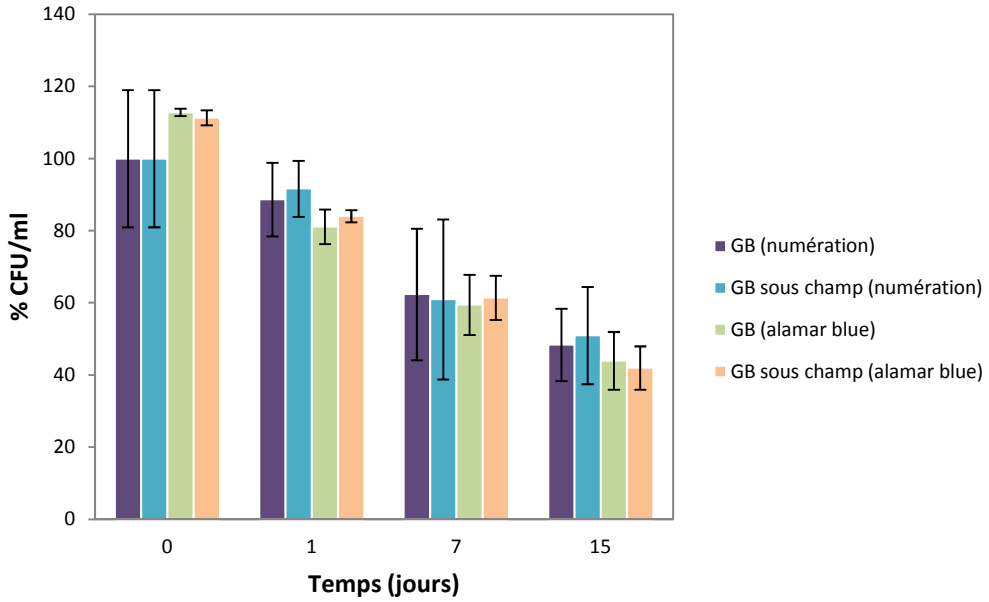


Figure 11 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice en présence et en absence d'un champ magnétique selon le test Alamar Blue et le comptage sur boîtes, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Les résultats obtenus pour les tests de viabilité par la méthode Alamar Blue ont été comparés au comptage sur boîtes (Fig. 11). Le nombre de bactéries viables dans les gels exposés ou non au champ magnétique a été déterminé au cours du temps à t = 0, 1, 7 et 15 jours. La référence à 100 % (non présentée sur le graphique) correspond au taux de bactéries viables dans la suspension avant l'encapsulation. Directement après l'encapsulation à t=0, les matrices ne sont pas exposées au champ magnétique. Nous pouvons observer une bonne corrélation entre les deux techniques avec une diminution du nombre de bactéries au cours du temps. Toutefois, le pourcentage de cellules viables comptabilisées sur boîtes de Pétri présente parfois de gros écarts-types (à t=0 et t=7 jours) contrairement à la méthode Alamar Blue, ce qui nous laisse donc suggérer que cette nouvelle méthode est plus reproductible que celle par comptage. Ces résultats nous montrent également d'autres informations. Il semblerait que les bactéries *Escherichia coli* soient viables cultivables après resuspension des gels, ce qui nous a permis d'établir une bonne corrélation entre les deux tests. De plus, nous pouvons constater que le champ magnétique n'influence pas la viabilité des cellules encapsulées. Ces observations sont très positives pour mener à bien les expériences sur la biominéralisation par les bactéries magnétotactiques que nous verrons dans le prochain chapitre.

C. Dosage de l'ATP

Le dosage de l'ATP extrait des cellules est particulièrement intéressant car il peut nous renseigner sur d'éventuels changements de l'activité métabolique des cellules immobilisées dans les

matrices et permet également de revenir au nombre de cellules viables si la production d'ATP par cellule est constante au cours du temps.

1. Viabilité des bactéries en absence d'un champ magnétique

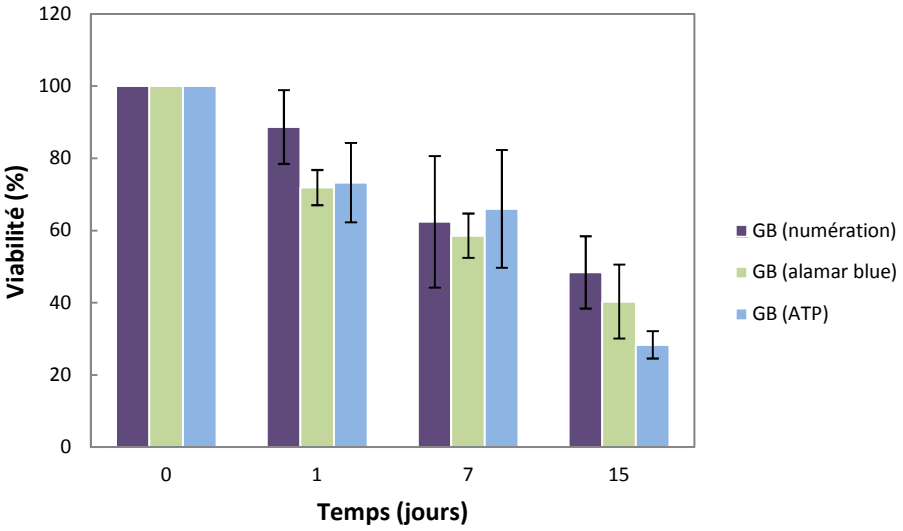


Figure 12 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice déterminée par la numération sur boîtes (en violet), le test Alamar Blue (en vert) et l'ATP-métrie (en bleu), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Les concentrations en ATP ont été déterminées après resuspension des gels dans du tampon phosphate et une extraction par lyse cellulaire dans un tampon d'extraction (cf. Annexe 12). La sensibilité de cette méthode dépend très fortement des conditions d'expérimentation (conservation des échantillons, température, temps d'extraction et de mesures, dilutions,…). Les concentrations en ATP ont été évaluées au cours du temps entre 0 et 15 jours. Cependant, contrairement aux expériences menées auparavant par le biais des tests Alamar Blue et de la numération sur boîtes, nous avons pris comme référence à 100 %, la quantité d'ATP dosée directement après l'encapsulation des cellules (t=0). En effet, la concentration d'ATP extrait pour les cellules en suspension avant l'encapsulation était de 2 nM +/- 1 nM pour 10^6 CFU. Cette incertitude sur les mesures, nous a donc conduit à redéfinir une référence qui s'affranchit également de l'effet de l'encapsulation.

Les pourcentages d'ATP dosés (en bleu) ont été comparés aux pourcentages de viabilité obtenus pour les méthodes Alamar Blue (en vert) et le comptage sur boîtes (en violet) (Fig. 12). La référence à 100 % pour les résultats des tests Alamar Blue et de la numération sur boîtes correspond également au pourcentage de viabilité à t=0 directement après l'encapsulation. Nous pouvons constater une diminution du nombre de bactéries viables au cours du temps. Les pourcentages d'ATP peuvent être parfaitement corrélés au nombre de bactéries viables déterminé par les tests Alamar

Blue et la numération entre 0 et 7 jours. Ceci nous laisse donc supposer que la quantité d'énergie produite par les cellules est constante dans les gels et peut nous renseigner sur le nombre de bactéries viables.

Au bout de 15 jours, le pourcentage d'ATP dosé est légèrement plus faible que les pourcentages de bactéries viables déterminés par la méthode Alamar Blue et la numération. En effet, le taux de bactéries viables passe de 40 % (Alamar Blue) à 28 % (ATP-métrie), ce qui pourrait suggérer une légère sous-production d'énergie par les bactéries.

2. Viabilité des bactéries en présence d'un champ magnétique

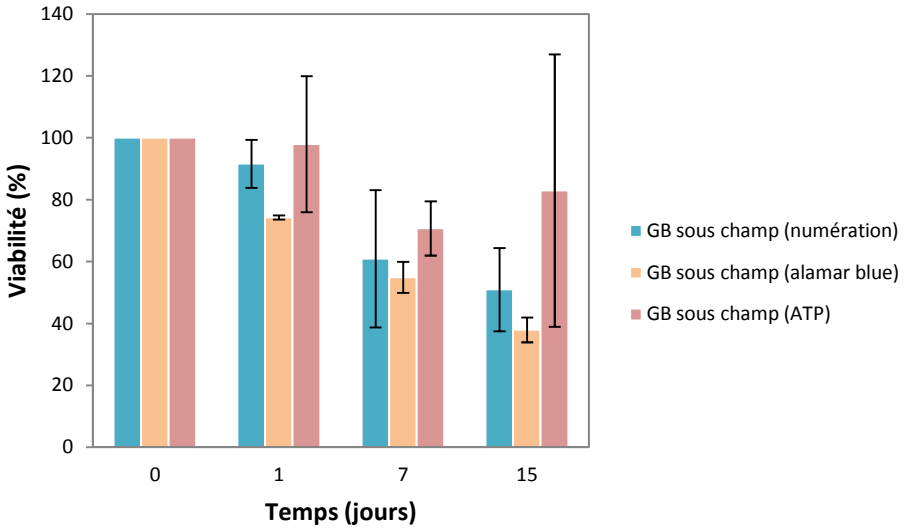


Figure 13 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice déterminée par la numération sur boîtes (en bleu), le test Alamar Blue (en orange) et l'ATP-métrie (en rose) en présence d'un champ magnétique, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Les pourcentages d'ATP dosés ont également été déterminés pour les cellules encapsulées en présence d'un champ magnétique (en rose) (Fig. 13). Ces valeurs ont été comparées aux pourcentages de viabilité déterminés par la numération (en bleu) et par les tests Alamar Blue (en orange). Etant donné que les pourcentages de viabilité obtenus par la méthode Alamar Blue sont très reproductibles, il est donc plus judicieux de comparer ces valeurs à celles obtenues par l'ATP-métrie. Nous pouvons alors constater d'une manière générale que les valeurs moyennes d'ATP sont supérieures aux pourcentages de viabilité obtenus par la réduction du colorant. Les pourcentages moyens d'ATP déterminés à 15 jours sont très élevés par rapport aux pourcentages de viabilité déterminés par les autres méthodes. Cette grande incertitude au bout de 15 jours, nous laisse suggérer qu'il pourrait y avoir eu des problèmes lors de la mesure.

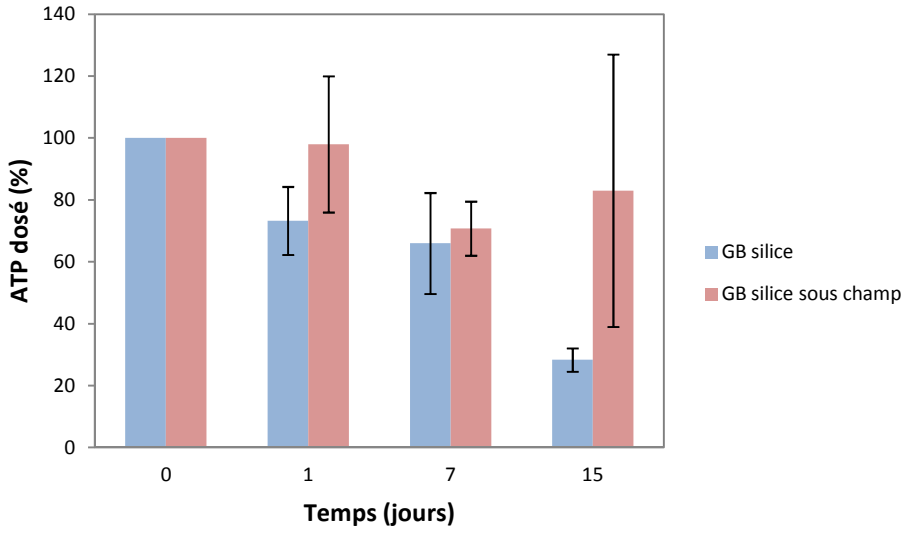


Figure 14 : Pourcentages d'ATP dosés pour les cellules encapsulées dans les gels de silice en présence d'un champ (en rose) et en absence d'un champ (en bleu), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Afin de mieux percevoir l'effet du champ magnétique, nous avons représenté les pourcentages d'ATP dosés au cours du temps en présence (en rouge) et en absence d'un champ magnétique (en bleu) (Fig.14). Nous avons pu remarquer précédemment que le champ magnétique n'affectait pas la viabilité des cellules déterminée par les tests Alamar Blue et la numération sur boîtes. Cela suggère donc que les quantités d'ATP mesurées en présence et en absence d'un champ magnétique peuvent être aisément comparées. Ainsi toute variation dans les pourcentages d'ATP pour les bactéries exposées ou non au champ, pourrait être liée à des productions d'énergie différentes. Par exemple, une augmentation du pourcentage d'ATP pourrait être liée à une surproduction énergétique par les bactéries. Les résultats montrent que les taux d'ATP dosés à 1 et 15 jours en présence d'un champ magnétique sont supérieurs ou égaux (si l'on tient compte des écarts types) à ceux mesurés en absence d'un champ. Nous pouvons observer une corrélation entre la production d'énergie en présence et en absence d'un champ au bout de 7 jours.

3. Production d'ATP en présence et en absence d'un champ magnétique

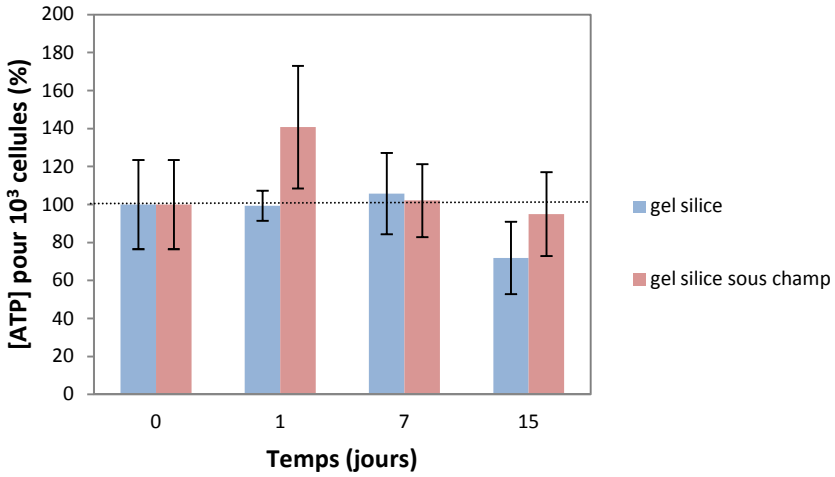


Figure 15 : Production d'ATP pour 10^3 cellules dans les gels de silice sous champ (en rose) et sans champ (en bleu)

Afin de déceler une éventuelle surproduction d'ATP par les cellules, nous avons reporté la concentration d'ATP dosés au nombre de bactéries déterminé par les tests Alamar Blue. La concentration d'ATP pour chaque échantillon a été divisée par le nombre de bactéries puis par un calcul, il a été possible de revenir au taux de production d'énergie pour 1000 bactéries. Cette méthode permet de voir directement si l'activité métabolique des bactéries est constante au cours du temps ou bien si elle évolue. Comme nous pouvons le constater, la production d'ATP reste constante entre 0 et 7 jours pour les bactéries encapsulées en absence d'un champ puis on observe une sous-production moyenne d'énergie au bout de 15 jours qui n'est très peu significative au vu des barres d'erreur (Fig. 15). Pour les bactéries exposées au champ magnétique, nous remarquons une production constante à t = 0, 7 et 15 jours et une surproduction au bout d'1 jour d'encapsulation qui semble significative. D'après ces résultats, nous constatons que les pourcentages de viabilité déterminés par l'ATP-métrie au bout de 15 jours d'encapsulation sous champ ont été biaisés (Fig. 14). En effet, les expériences réalisées pour la quantification d'ATP au bout de 15 jours ont été effectuées indépendamment des autres manipulations pour le suivi au cours du temps sur 7 jours. Au cours des expériences au bout de 15 jours, la concentration en ATP à t=0 a également été déterminée pour avoir une référence. Après vérifications, nous avons pu constater que les valeurs à t=0 étaient sous-estimées en raison des erreurs probables dans le dosage ou l'extraction de l'ATP. Comme les pourcentages de viabilité sont directement déduits de la valeur de référence à t=0, une sous-estimation de celle-ci conduit directement à une surestimation de l'ATP au bout de 15 jours. De ce fait, le pourcentage d'ATP à 15 jours était donc surestimé sur deux expériences ce qui explique la forte quantité d'ATP avec des écarts types importants.

4. Effet du champ magnétique au bout d'1h d'encapsulation

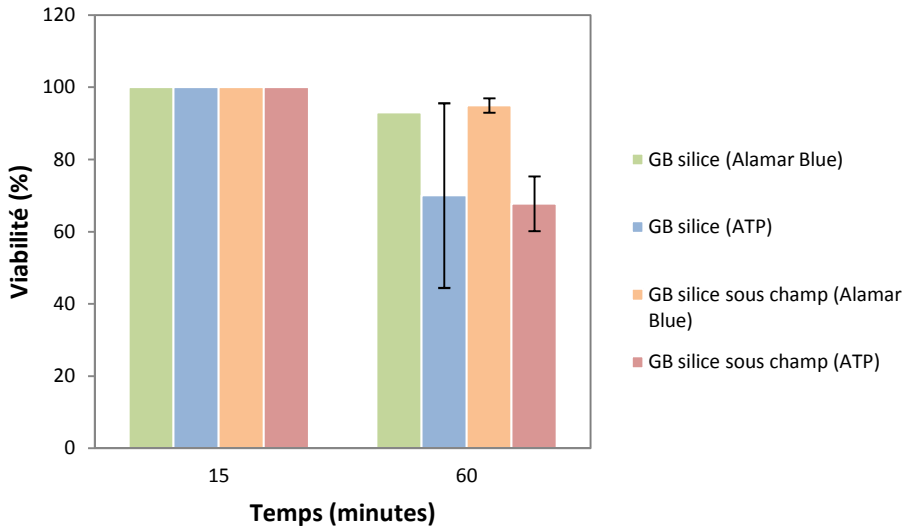


Figure 16 : Pourcentages de viabilité des cellules au bout d'1h d'encapsulation dans les gels de silice en présence d'un champ magnétique (orange et rose) et en absence d'un champ magnétique (en vert et bleu)

Selon des études menées par Filipic *et al.,* 2012, les *Escherichia coli* exposées à un champ magnétique de 57 mT pendant 1h, augmentaient leur production d'ATP. Nous avons donc voulu savoir si dans nos conditions expérimentales, les bactéries produiraient plus d'ATP au bout d'1h d'encapsulation sous un champ de 80 mT. Comme nous pouvons le constater dans la figure 16, le pourcentage d'ATP mesuré au bout d'une heure en présence d'un champ magnétique diminue par rapport au pourcentage de viabilité déterminé par le test Alamar Blue. Cette diminution est toutefois moins visible pour les bactéries encapsulées en absence d'un champ étant donné les écarts types. Cependant, lorsque les pourcentages d'ATP ont été reportés au nombre de cellules en pM pour 1000 cellules, les bactéries produisaient moins d'énergie dans les deux situations. Il semblerait donc qu'il y ait un stress après 1h d'encapsulation où les bactéries pourraient adapter leur métabolisme.

D. Microscopie Electronique en Transmission (MET)

1. Bactéries encapsulées dans les gels à base de magnétite de 10 nm

D'après les observations en MET, les bactéries se trouvent parfois isolées ou bien par deux ou trois dans les gels de silice à différentes concentrations en nanoparticules de magnétite de 10 nm. Nous pouvons remarquer également qu'au bout de 16h d'encapsulation, les gels présentent bien une macroporosité conférant ainsi un espace suffisant pour permettre aux bactéries de se déplacer légèrement ou peut-être même se diviser (Fig. 17 a). Le réseau de silice n'est pas directement en contact avec les bactéries probablement en raison de la présence de glycérol autour des cellules. En

effet, le glycérol joue le rôle d'osmoprotecteur. Il s'accumule autour des membranes cellulaires et permet ainsi d'éviter le flux d'eau à l'extérieur des cellules (Nassif *et al.,* 2002). La présence de bactéries parfois par paire peut suggérer une division cellulaire ou bien que les bactéries ne sont pas parfaitement bien dispersées lors de la formation du gel. D'après ces observations, nous pouvons remarquer que l'intégrité membranaire des bactéries est préservée dans les gels de silice supplémentés en nanoparticules de magnétite au bout de 16h.

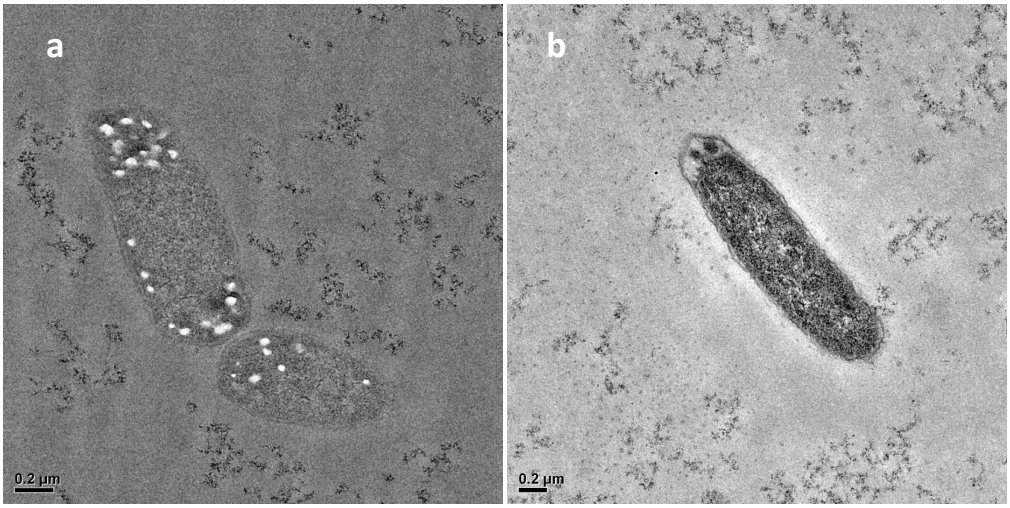


Figure 17 : Clichés MET des bactéries *E.coli* encapsulées dans les gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à 1,25 g/l au bout de 16h (a) et 24h (b)

Au bout de 16h d'encapsulation dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 1,25 g/l, les bactéries présentent des vésicules blanches le long de la membrane plasmique (Fig. 17 a). Ces vésicules ont été identifiées comme étant des granules de polyphosphates par analyse EdX au MEB. En microscopie électronique, ces organelles de polyphosphates contiennent un matériau amorphe et dense aux électrons mais lorsque les bactéries sont observées en coupe, le matériau dense peut être perdu en partie ou entièrement (Docampo *et al.,* 2005). Comme nous avons pu le constater, les images en microscopie montrent des vésicules vides apparaissant en blanc.

Les granules de polyphosphates sont des homologues des acidocalcisomes, une organelle servant dans le métabolisme et le stockage des polyphosphates (polyP) (Seufferheld *et al.,* 2008). Les polyphosphates se présentent sous forme de chaines linéaires de polymères de phosphate et sont des molécules flexibles pouvant fournir de l'énergie au cours de l'hydrolyse générant ainsi des phosphates (Docampo *et al.,* 2005). Les granules de polyphosphates permettent de limiter le stress osmotique et le stress lié au manque de nutriments (Ault-Riché *et al.,* 1998) ce qui pourrait expliquer leur présence au sein des *Escherichia coli* encapsulées dans les matrices en raison de la présence de sels (0,15 M de NaCl) et de l'absence de nutriments. Les granules présentent également d'autres fonctions telles que le stockage des ions calcium, sodium, potassium qui sont alors combinés aux

polyphosphates, ce qui permet de réguler l'homéostasie (Seufferheld *et al.,* 2008). Entre 0 et 16h, les cellules semblent donc stocker l'ATP sous forme de polyphosphates. Au bout de 24h d'encapsulation, la présence de granules se fait plus rare (Fig. 17 b). Toutefois, il est important de noter que l'observation de ces granules est dépendante de la zone de coupe de l'échantillon ce qui veut dire que de simples observations ne permettent pas de conclure sur l'absence de granules de polyP dans les différents échantillons.

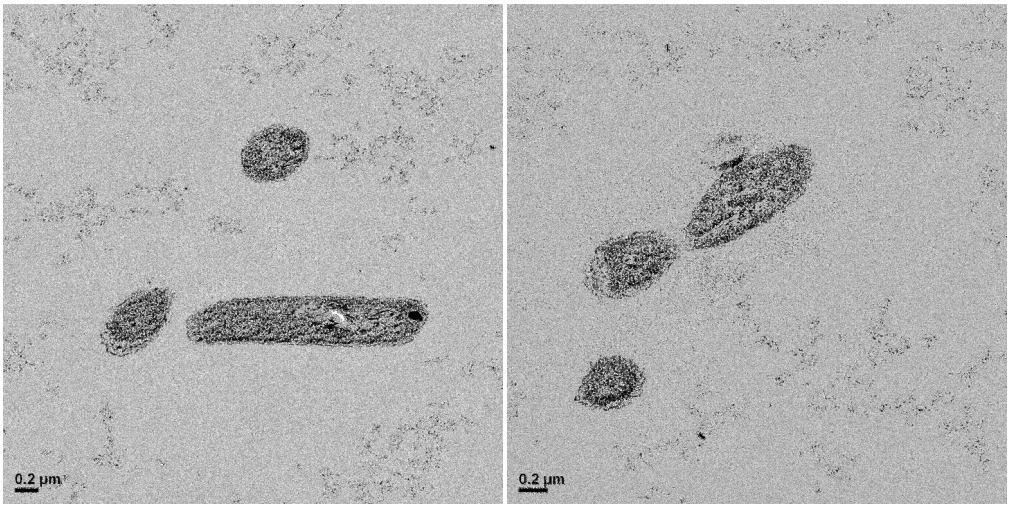


Figure 18 : Clichés MET des bactéries *E.coli* encapsulées dans les gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à 2,5 g/l au bout de 24h

Les bactéries immobilisées durant 24h dans les gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à 2,5 g/l présentent également une bonne intégrité membranaire (Fig. 18).

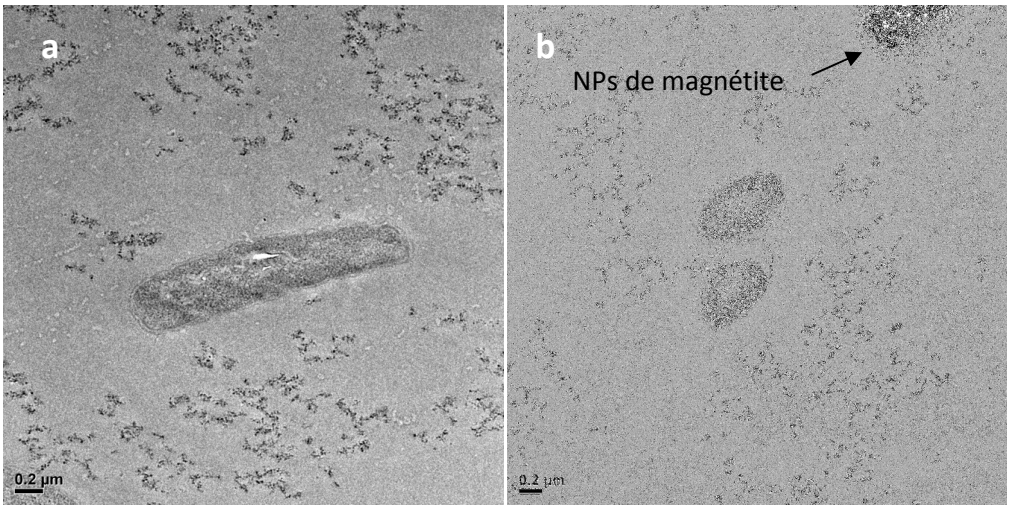


Figure 19 : Clichés MET des bactéries *E.coli* encapsulées dans les gels de silice conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l au bout de 16h (a) et 24h (b)

Les gels bactériens préparés avec une suspension de magnétite à 5 g/l contiennent des agrégats de magnétite insérés dans le réseau de silice sans être en contact avec les bactéries (Fig. 19-

b). Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi la viabilité des cellules est identique dans les gels de silice et les gels à base d'oxyde de fer.

2. Bactéries encapsulées dans le gel de silice

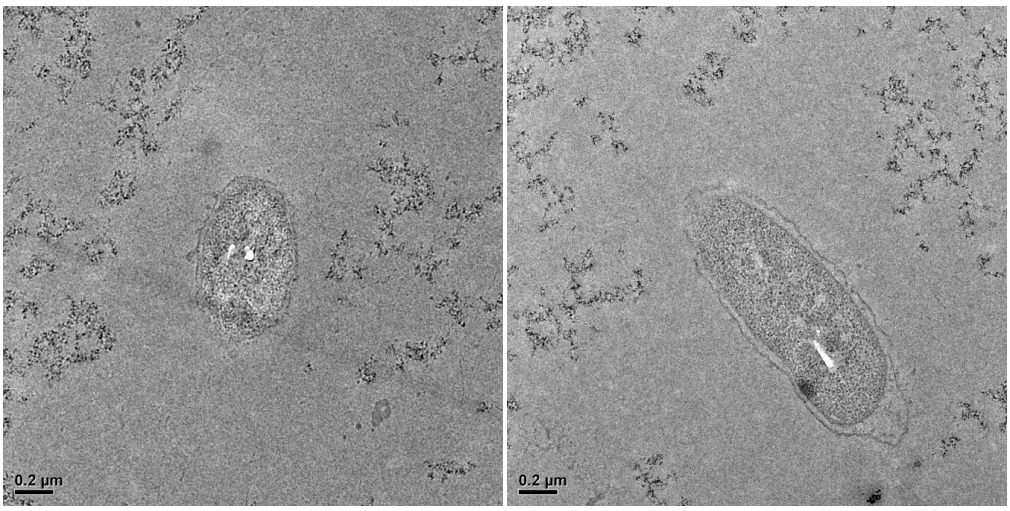


Figure 20 : Clichés MET des bactéries *E.coli* encapsulées dans les gels de silice au bout de 16h

Au bout de 16h d'encapsulation dans la silice (Fig. 20), les bactéries semblent également contenir des granules de polyphosphates mais en plus faibles quantités par rapport aux bactéries encapsulées avec la magnétite. En effet, les granules de polyphosphates peuvent également contenir des ions tels que le fer, sodium ou autres (Seufferheld *et al.,* 2008). Il se pourrait donc que les bactéries en présence de magnétite accumulent le fer biodisponible dans les granules. La présence de granules de polyphosphates au bout de 16h montre une activité métabolique des cellules qui vont alors produire l'ATP et le stocker sous forme de polyP pour avoir une réserve d'énergie.

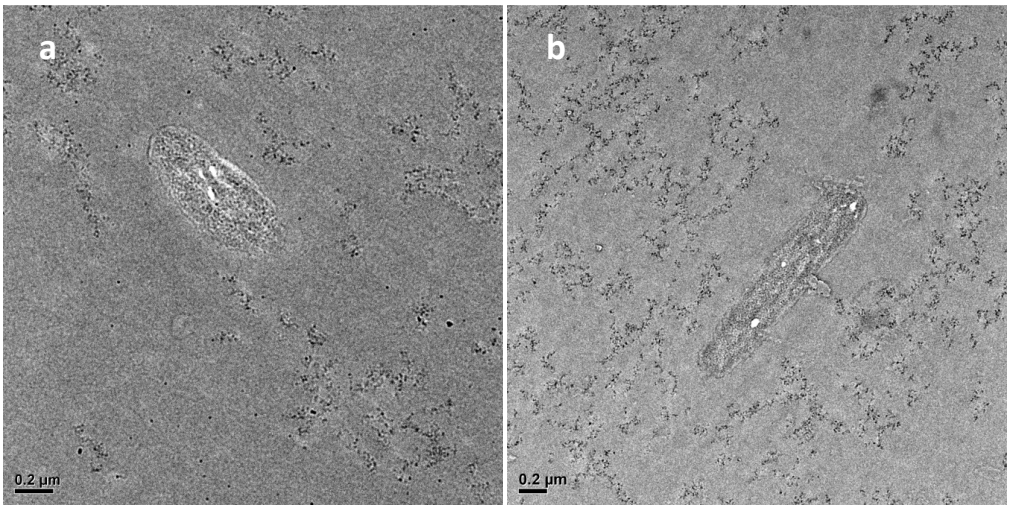


Figure 21 : Clichés MET des bactéries *E.coli* encapsulées dans les gels de silice au bout de 24h sans champ (a) et en présence d'un champ (b)

En présence et en absence d'un champ magnétique, les bactéries encapsulées dans la silice au bout de 24h présentent toujours des granules de polyphosphate (Fig. 21). La production d'ATP pour le stockage dans les granules ou bien la dégradation des polyphosphates générant de nouveau de l'ATP pourraient être détectées par les dosages d'ATP. Ces observations pourraient peut-être expliquer une quantité d'énergie légèrement plus importante détectée par ATP-métrie au bout de 24h sous champ. Toutefois, il est impossible d'en tirer des conclusions hâtives sur ces processus très complexes. Un dosage des polyphosphates aurait permis de mieux comprendre ces phénomènes. En effet, après extraction des polyP et une conversion de ceux-ci en ATP par une polyphosphate kinase (PPK), il est possible de quantifier l'ATP qui a été stocké dans les granules (Ault-Riché *et al.,* 1998). Les polyphosphates kinase peuvent catalyser la polymérisation du phosphate terminal de l'ATP en polyP ou bien convertir les polyP en ATP en utilisant l'ADP (Adénosine Diphosphate) (Zhang *et al.,* 2002 ; Kornberg A., 1995).

E. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les observations au MEB nous donnent d'autres informations particulièrement intéressantes. En effet, nous pouvons remarquer que les nanoparticules de magnétite (petits points blancs) sont insérées dans le réseau de silice (en gris) et se présentent sous forme isolée ou agrégée (Fig. 22).

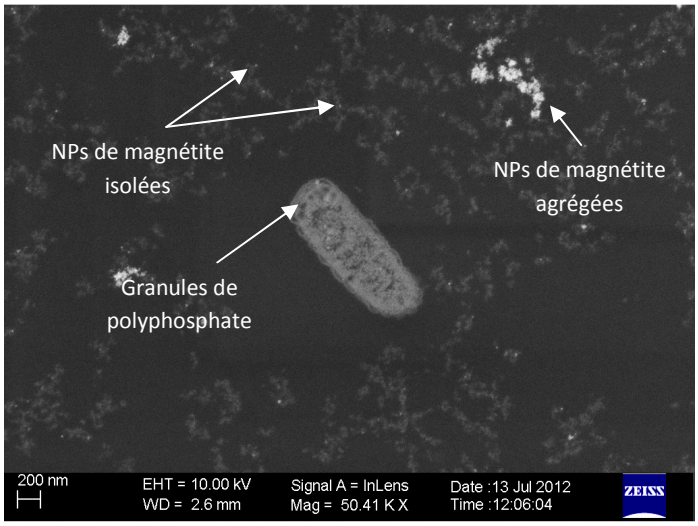


Figure 22 : Cliché MEB d'une bactérie *E.coli* encapsulée dans un gel de silice contenant de la magnétite au bout de 16h

Nous pouvons remarquer également que les bactéries contiennent des granules de polyphosphates le long de la membrane cytoplasmique (vésicules sombres).

F. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons évalué la cytocompatibilité des matrices de silice supplémentées ou non de nanoparticules d'oxydes de fer à différentes concentrations. Nous avons pu remarquer que la viabilité des bactéries encapsulées n'était pas affectée en présence des particules magnétiques de 10 nm pour les concentrations testées.

Cette étude nous a permis de voir que, malgré une baisse de viabilité, les bactéries préservaient leur activité métabolique après 15 jours d'encapsulation dans les matrices de silice. En effet, l'activité respiratoire déterminée par le test Alamar Blue, était identique aux cellules en suspension avant l'encapsulation. D'après Nassif et *al.,* 2003, l'activité métabolique des *Escherichia coli* encapsulées dans des gels de silice mésoporeux avec du glycérol est en effet préservée. La viabilité des cellules immobilisées avait été dans cette dernière étude suivie par incorporation du [^{14}C] glucose en condition aérobie. Les résultats avaient montré que pour les gels contenant du glycérol, le pourcentage d'incorporation du glucose au bout de 15 jours pouvait être corrélé au comptage sur boîtes. Ces expériences concordent bien avec les tests que nous avons réalisés par la technique Alamar Blue et l'ATP-métrie qui montraient que l'activité métabolique des bactéries encapsulées était préservée. En présence d'un champ magnétique statique de 80 mT, les bactéries immobilisées dans les gels de silice préservaient également leur activité métabolique (cf. les tests Alamar Blue). Ces résultats concordent bien avec les travaux de Strasak *et al.,* 2002 où les *E.coli* étaient métaboliquement actives sous un champ de 10 mT. Toutefois, nos études ont montré qu'il y aurait une éventuelle surproduction d'ATP au bout de 24h d'encapsulation. Selon Fillipic *et al.,* 2012, les bactéries *E.coli* exposées à un champ statique de 57 mT augmenteraient leur concentration en ATP intracellulaire en raison du stress après 1h d'exposition au champ. Cette élévation d'ATP pourrait s'expliquer par une activation des transporteurs membranaires du calcium et du sodium, ce qui aurait pour conséquence de modifier le flux des ions à travers la membrane (Rosen *et al.,* 2003). Le champ magnétique statique pourrait influencer les transporteurs membranaires en raison de l'orientation des lipides de la membrane qui sont diamagnétiques et des propriétés membranaires telles que le niveau de tension et la flexibilité (Hughes *et al.,* 2005 ; St Pierre & Dobson, 2000). Nous avons également quantifié l'ATP en présence et en absence d'un champ magnétique après 1h d'encapsulation. Les résultats ont montré que les taux d'ATP en présence d'un champ magnétique étaient inférieurs aux pourcentages de viabilité déterminés par le test Alamar Blue, ce qui pourrait suggérer soit une diminution de l'activité métabolique des cellules au niveau de la production d'ATP soit un stockage important de l'ATP sous forme de polyP non détectables par l'ATP-métrie.

Au bout de 16h d'encapsulation dans les matrices magnétiques (à base d'oxyde de fer), les bactéries présentaient de nombreuses granules de polyphosphates. Ces polyP interviennent dans

une large variété de procédés physiologiques chez les bactéries et notamment dans le développement des biofilms, la mobilité, les quorum sensing et la virulence (Brown *et al.,* 2004 ; Rao & Torriani, 1990 ; Rashid *et al.,* 2000[a, b, c] ; Shi *et al.,* 2004). Les polyphosphates permettent aux organismes de s'adapter aux conditions extrêmes telles que la pression, le pH, la température, l'osmolarité, la salinité, les radiations UV et la dessication (Rothschild & Mancinelli, 2001 ; Seufferheld *et al.,* 2008). Les polyphosphates peuvent chélater les ions manganèse, zinc et fer ainsi que les métaux lourds présents dans l'environnement tels que le nickel et le cadmium (Seufferheld *et al.,* 2008 ; Kulaev *et al.,* 1999). Nous avons pu observer que les bactéries encapsulées dans les matrices de silice contenant des oxydes de fer, semblaient contenir plus de granules de polyphosphates que les bactéries immobilisées seulement dans la silice. Ces observations pourraient suggérer que le fer dissous présent dans la suspension de magnétite pourrait être chélaté aux polyphosphates, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de vésicules au sein des bactéries. Les bactéries piégées dans les gels de silice présentaient un peu de granules de polyP au bout de 16h d'encapsulation en absence d'un champ et à 24h d'encapsulation sous champ. Cette production de polyP peut être directement liée au stress de l'encapsulation marquée par la présence de sels et l'absence de nutriments mais également en raison du champ magnétique qui pourrait affecter les transporteurs membranaires et favoriser l'entrée des ions sodium qui vont alors se complexer aux polyP.

D'une manière plus générale, ces expériences nous ont montré toute la difficulté d'obtenir des résultats les plus reproductibles possibles sur trois techniques utilisées en parallèle (numération sur boîtes, Alamar Blue et ATP-métrie). Les tests Alamar Blue et l'ATP-métrie ont pu être validés sur les bactéries *Escherichia coli* malgré les limites liées aux problèmes de resuspension des gels et des microorganismes encapsulés qui pourraient entrer dans un mode « viable non cultivable » non détectable par la méthode de numération sur boîtes.

Nous avons pu montrer que les gels étaient cytocompatibles, ce qui nous a donc permis de poursuivre les études sur les bactéries magnétotactiques. Les expériences menées sur les *Escherichia coli* nous ont conduits à sélectionner deux matrices pour le suivi de la viabilité des bactéries magnétotactiques. Il s'agit des gels de silice et des gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l qui seront étudiés en présence et en absence d'un champ magnétique statique.

PARTIE II- ENCAPSULATION DES BACTERIES *MAGNETOSPIRILLUM MAGNETICUM*

Après l'étude de viabilité des bactéries *Escherichia coli* au sein des différentes matrices minérales dans des conditions cytocompatibles, le procédé de bioencapsulation a donc pu être étendu à d'autres microorganismes tels que les bactéries magnétotactiques. Les études précédentes sur les *E.coli* ont montré qu'un champ magnétique statique de 80 mT n'influençait pas de manière détectable la viabilité des cellules dans les gels de silice. Dans la littérature, les études menées à ce jour sur l'effet du champ magnétique sur les microorganismes sont encore très contradictoires et dépendent du type de cellule, des conditions abiotiques telles que la température ainsi que du temps d'exposition, de la force et de l'homogénéité du champ (Filipic *et al.,* 2012 ; Fojt *et al.,* 2004 ; Horiuchi *et al.,* 2001). Les conditions expérimentales jouent donc un rôle important. Ainsi en changeant seulement de microorganisme, nous verrons si les bactéries magnétotactiques seront affectées par un champ magnétique statique. Tout comme les *E.coli*, nous avons réalisé les mêmes tests de viabilité sur les bactéries magnétotactiques immobilisées dans des gels de silice et des matrices contenant des nanoparticules d'oxydes de fer. Les bactéries encapsulées ont ensuite été exposées au champ magnétique statique pendant 15 jours. Dans la première partie, nous nous intéresserons au procédé d'encapsulation des bactéries magnétotactiques puis dans une seconde partie nous étudierons la viabilité des cellules immobilisées dans les différentes matrices.

I. Procédé d'encapsulation des bactéries magnétotactiques

A. Description des bactéries *Magnetospirillum magneticum*

Lors de notre étude, nous avons utilisé les bactéries *Magnetospirillum magneticum* (AMB-1). En effet, ces bactéries ont été séquencées et peuvent être mises en culture en aérobie ou anaérobie. Elles sont donc particulièrement simples à cultiver par rapport à d'autres bactéries magnétotactiques qui sont microaérophiles strictes telles que les *M. magnetotacticum* (MS-1) (Blakemore *et al.,* 1979 ; Maratea & Blakemore, 1981). Dans l'environnement, on retrouve les *Magnetospirillum magneticum* dans les sédiments des eaux douces. Les AMB-1 de forme hélicoïdale ou spirillée font 0,4-0,6 µm de largeur et 3 µm de longueur (Matsunaga *et al.,* 1991). Ces bactéries ont la particularité de synthétiser de la magnétite intracellulaire dans des conditions micro-oxiques ou anoxiques en utilisant les nitrates comme accepteur d'électrons final. Les facteurs influençant la production des magnétosomes sont l'oxygène et l'oxyde d'azote (Bazylinski & Frankel, 2004). Lorsque ces cellules poussent en aérobie, elles ont une activité oxydase (Matsunaga & Sakaguchi, 2000). Tout comme les *Escherichia coli*, les AMB-1 sont gram négatif et possèdent un flagelle à chaque pôle permettant leur

déplacement rapide. La taille des magnétosomes et la longueur des chaines sont dépendantes des conditions de culture des bactéries (concentration en fer, présence de chélatants,…) (Alphandéry *et al.,* 2012). Dans des conditions micro-oxiques, les bactéries en culture commencent à produire des magnétosomes entre 20 et 24h d'incubation (Li *et al.,* 2009[a]). Les cristaux de magnétite sont synthétisés simultanément et dispersés à de multiples sites à l'intérieur de la cellule. La croissance des particules biogéniques se poursuit jusqu'à 48h d'incubation et après 96h, les bactéries présentent des magnétosomes de forme cubo-octaédrique et dont la taille moyenne est de 45 nm (Fig. 23). La production des magnétosomes se déroule pendant la phase de croissance exponentielle et stationnaire (Li *et al.,* 2009[a]). La plupart des bactéries magnétotactiques présentent entre 15 et 20 magnétosomes de 50 nm de diamètre environ (Komeili A., 2007).

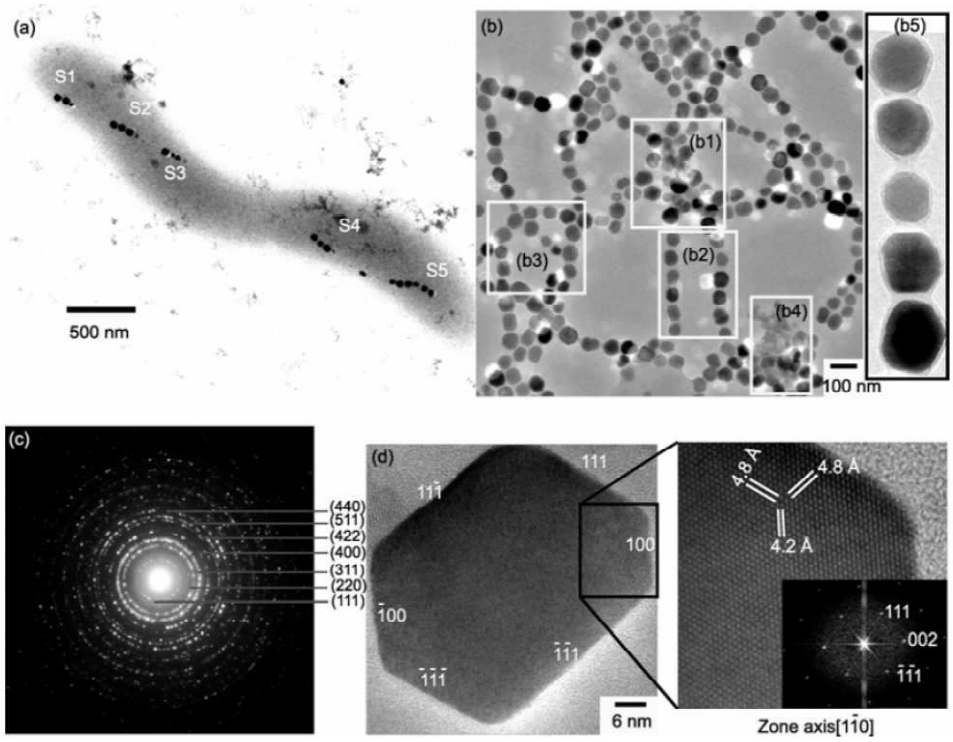


Figure 23 : Images MET (a) d'une bactérie AMB-1 présentant plusieurs chaînes de 3 à 5 magnétosomes (S1 à S5); (b) des chaînes de magnétosomes extraites des AMB-1 ; (c) Diffraction électronique en sélection d'aire (SAED) d'un groupe de magnétosomes isolés dont l'analyse montre que les cristaux de magnétite sont monocristallins ; (d) Image MET en haute résolution montrant un cristal de forme cubo-octaédrique (selon Li *et al.,* 2009[b])

B. Choix du milieu de culture

Les bactéries magnétotactiques utilisées pour l'encapsulation proviennent de la souche *Magnetospirillum magneticum* (ATCC® 700264™) (AMB-1).

Le protocole de mise en culture des bactéries a été optimisé afin de récupérer des *cellules magnétiques* (avec des magnétosomes) et des *cellules non magnétiques* (sans magnétosomes). Il était particulièrement intéressant d'étudier le comportement de ces deux types de cellules au sein

des gels. En effet, les bactéries produisant des magnétosomes sont cultivées dans un milieu riche en fer alors que les cellules non magnétiques sont privées de fer. La composition du milieu initial avant l'encapsulation pourrait donc jouer un rôle important sur l'état physiologique des cellules lors de leur confinement dans un gel. La présence de magnétosomes au sein des bactéries pourrait également influencer la viabilité de celles-ci dans les matrices de silice. Les magnétosomes confèrent un avantage sélectif dans l'environnement, il est donc important de déterminer si ces bactéries survivent mieux ou non dans les gels lorsque leur déplacement est empêché.

Les bactéries sont cultivées en bouteille fermée (sans échanges de gaz) sous agitation en présence ou en absence de quinate de fer dans un milieu de croissance spécifique (Blakemore *et al.,* 1979 ; Yang *et al.,* 2001[b]). Lors de leur croissance, les bactéries vont alors progressivement consommer l'oxygène du milieu (respiration aérobie) qui en s'appauvrissant conduit à des conditions micro-oxiques nécessaires pour la production des magnétosomes. Ces microorganismes ont été cultivés dans deux milieux différents en présence de 20 µM de fer pour permettre la production des magnétosomes et en absence de fer pour inhiber leur formation. Les conditions de mise en culture peuvent influencer la croissance et la production des magnétosomes. Par exemple, la présence de chélatants facilite l'absorption du fer, c'est pourquoi nous avons ajouté de l'EDTA dans les milieux de culture (Alphandery *et al.,* 2012). La production des magnétosomes est dépendante de la concentration en fer et des conditions micro-oxiques du milieu. Des études ont montré que la formation des magnétosomes se produisait à des concentrations de 15-20 µM de fer (Schüler & Baeuerlein, 1996). Les bactéries magnétotactiques peuvent accumuler du fer à plus de 2 % de leur poids sec (Blakemore *et al.,* 1979), c'est-à-dire environ 100 fois plus que les bactéries *Escherichia coli* (Hartmann & Braun, 1981 ; Matzanke *et al.,* 1989 ; Hudson *et al.,* 1993).

Les AMB-1 ont donc été cultivées dans un milieu riche (contenant diverses sources carbonées, des minéraux et des vitamines) avant d'être encapsulées contrairement aux *Escherichia coli* qui étaient cultivées dans un milieu minimum phosphaté et complémenté en glucose avant d'être immobilisées dans les matrices. Ces conditions permettaient d'éviter un stress trop important lors du piégeage des *E.coli*. Nous avons toutefois décidé de garder le milieu de culture classique des bactéries magnétotactiques sans les adapter dans le milieu minimum supplémenté en glucose avant l'encapsulation afin de conserver les bactéries avec des chaines de magnétosomes pour les cultures des *cellules magnétiques*. Les milieux de culture pour les bactéries magnétiques (avec magnétosomes) et non magnétiques (sans magnétosomes) doivent avoir des compositions très proches afin de pouvoir comparer le comportement des cellules dans le gel. Ainsi, nous avons seulement enlevé la source de quinate de fer pour la culture des bactéries sans magnétosomes.

C. Courbes de croissance et état physiologique des bactéries encapsulées

La préparation des cultures se réalise au moyen d'un repiquage, c'est-à dire qu'une petite quantité de bactéries issues d'une préculture est introduite dans un nouveau milieu pour permettre leur croissance dans des conditions contrôlées (cf. Annexe 9). Pour les différentes cultures (avec ou sans fer), les bactéries introduites possèdent des magnétosomes.

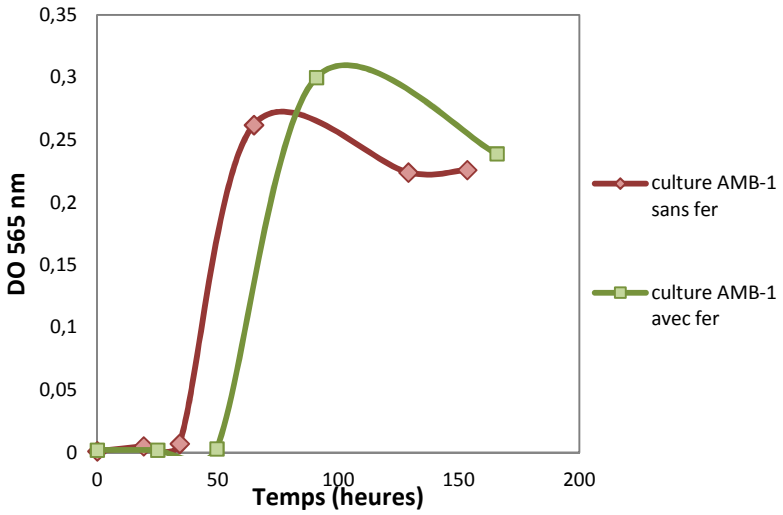


Figure 24 : Courbes de croissance des AMB-1 en présence de fer (en vert) et en absence de fer (en rouge). Densité Optique (DO) en fonction du temps

Les AMB-1 sont incubées pendant 7 jours à 30°C dans un milieu de croissance modifié. Les courbes de croissance représentées dans la figure 24, montrent une phase de latence de 25h en absence de fer et de 50 h en présence de fer. Puis les bactéries entrent dans une phase exponentielle et au bout de 3 à 4 jours, elles se trouvent en phase stationnaire. En présence de fer (10 µM), les bactéries présentent une phase de latence plus longue que celles incubées sans quinate de fer.

Pour les encapsulations, les bactéries ont d'abord été cultivées pendant 7 jours en présence ou en absence de fer pour obtenir des cellules magnétiques ou non magnétiques. Elles ont donc été encapsulées en phase stationnaire contrairement aux *Escherichia coli*. Plusieurs raisons ont conforté ce choix. La croissance des bactéries magnétotactiques ainsi que la production des magnétosomes sont influencées à la fois par la concentration de fer et par l'aération du milieu. Les concentrations en oxygène dans le milieu sont difficilement contrôlables dans les bouteilles et la présence de fer a tendance à augmenter la phase de latence. La croissance des cellules est également modifiée en fonction de la préculture de départ. Parfois les bactéries peuvent pousser très tardivement et produisent des magnétosomes seulement au bout de 7 jours. Etant donné que les cultures de ces bactéries sont difficilement reproductibles, il a été jugé plus judicieux de prendre des cultures de 7

jours pour être sûr qu'elles aient des magnétosomes. La culture des cellules non magnétiques est également incubée pendant 7 jours pour pouvoir être comparée aux cellules magnétiques. De plus, contrairement aux *Escherichia coli* qui peuvent atteindre une DO de 0,2 au bout de 3h30, les bactéries magnétotactiques quant à elles mettent 3 à 4 jours et ne dépassent pas une DO de 0,3. Afin d'avoir une quantité de cellules suffisante pour les encapsulations, il fallait donc les cultiver jusqu'en phase stationnaire.

D. Préparation des suspensions bactériennes pour l'encapsulation

Au bout de 7 jours d'incubation dans des bouteilles de 1 L (afin d'augmenter les quantités de cellules), les cultures avec ou sans fer sont centrifugées et resuspendues dans du tampon phosphate contenant 10 % de glycérol (cf. Annexe 10). Les cellules ne sont pas lavées dans du tampon mais seulement concentrées de manière à obtenir une suspension avec une densité optique de 2,5 pour les bactéries sans magnétosomes et de 5 pour les bactéries avec magnétosomes. Les AMB-1 cultivées sans fer sont généralement très petites contrairement à celles qui contiennent des magnétosomes dont la taille peut doubler. Cette différence conduit à des variations de densité optique qui peut ainsi augmenter en fonction de la taille des cellules. Une DO de 2,5 correspond à 2.10^9 cellules/ml environ pour les bactéries sans magnétosomes. Cette concentration en bactéries a été estimée par comptage sur boîte.

Contrairement aux *Escherichia coli*, les bactéries magnétotactiques ne peuvent pas sédimenter à la même vitesse lors de la centrifugation. Il a donc fallu augmenter le temps (30 min au lieu de 15 min) et la vitesse lors la centrifugation des cellules. Afin d'éviter un stress trop important, le culot n'a pas été lavé trois fois dans du tampon phosphate comme avec les *E.coli*. Il peut donc rester des traces de milieu de culture lors de la resuspension du culot dans du tampon phosphate supplémenté avec 10 % de glycérol.

Le protocole d'encapsulation des bactéries est réalisé de la même manière que pour les *Escherichia coli*. Les bactéries sont encapsulées pendant 15 jours dans les matrices de silice supplémentées ou non de nanoparticules d'oxyde de fer afin de déterminer l'effet de l'encapsulation sur la viabilité des cellules. D'autre part, les bactéries ont été exposées à un champ statique de 80 mT afin de voir si les cellules restaient viables sous l'effet du champ.

E. Suivi de la viabilité des cellules dans les gels

Pour le suivi de la viabilité des bactéries magnétotactiques dans les gels, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés. Contrairement aux *Escherichia coli*, les AMB-1 ont un temps de génération plus long (8-10 h) (Staniland *et al.,* 2010). Le suivi par numération sur boîtes contenant le milieu de croissance gélosé peut être relativement long et différent en fonction du type de cellules (avec magnétosomes ou sans magnétosomes) (Matsunaga *et al.,* 1991). Sous l'effet du stress, certaines bactéries peuvent devenir viables non cultivables conduisant ainsi à une sous-estimation du nombre exact de bactéries viables (Oliver J.D., 2005). Nous avons donc dans un premier temps optimisé les conditions de culture sur boîtes Pétri afin de permettre une croissance rapide sur un milieu gélosé.

Nous avons pu voir dans le chapitre précédent que les *Escherichia coli* poussaient très bien sur un milieu riche non sélectif LBA. Il était donc intéressant de voir si les bactéries magnétotactiques pouvaient pousser sur ce type de milieu. Nous avons donc pu constater que les bactéries sans magnétosomes pouvaient pousser très rapidement sur les boîtes LBA après 24h d'incubation à 30°C au lieu de plusieurs jours sur un milieu MGSM modifié. Après avoir optimisé les conditions de culture en milieu gélosé, nous avons pu réaliser des comptages sur boîtes pour les tests de viabilité (Fig. 25-a).

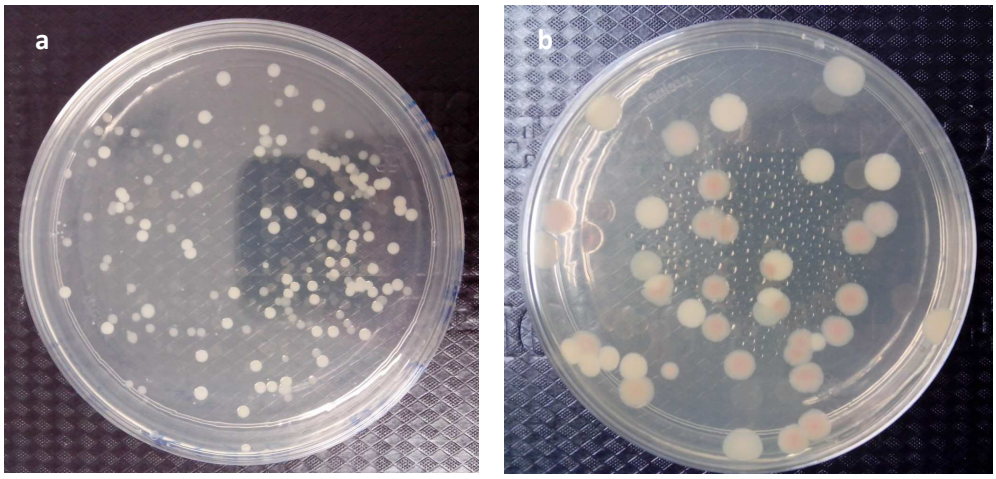


Figure 25 : Colonies des bactéries AMB-1 sur des boîtes de Pétri après 24h d'incubation à 30°C (a) et plusieurs jours dans une enceinte close (b)

Lorsque les boîtes de Pétri sont placées dans une enceinte close pendant plusieurs jours (conditions micro-oxiques) (Fig. 25-b), il est alors possible de voir le développement des colonies et le nombre de bactéries capables de produire de nouveau des magnétosomes (colonies marron clair).

Etant donné que la numération sur boîtes ne tient compte que des bactéries viables cultivables, il était donc nécessaire d'utiliser d'autres méthodes pour déterminer le nombre de cellules viables dans les gels. Nous avons donc procédé dans un premier temps à une numération par microscopie optique sur des cellules de Malassez mais les comptages se sont montrés très fastidieux en raison du déplacement très rapide des bactéries en fonction des concentrations en oxygène (aérotaxie) et du champ magnétique terrestre (magnétotaxie) (Fig. 26). Il était donc impossible de déterminer le nombre exact de cellules viables.

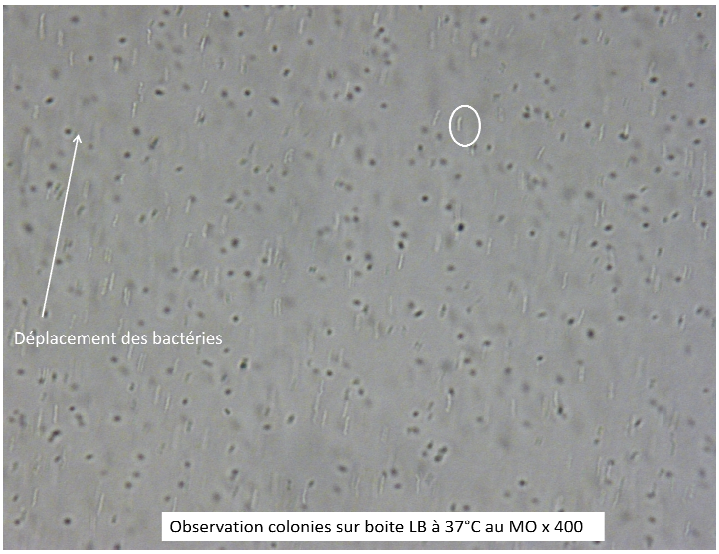


Figure 26 : Observation des bactéries magnétotactiques au microscope optique (MO) x 400 sur cellule de Malassez

Dans la partie précédente, la technique Alamar Blue a été développée sur des *Escherichia coli* extraites des gels afin de pouvoir l'appliquer sur les bactéries magnétotactiques par la suite. Nous avons pu voir une certaine corrélation entre le nombre de CFU/ml et le pourcentage de réduction de la résazurine. Cette méthode validée sur les *Escherichia coli*, nous a montré que les bactéries encapsulées préservaient leur activité métabolique. Ces observations pourraient suggérer que cette technique peut être appliquée sur d'autres cellules si l'activité respiratoire moyenne des *Escherichia coli* est identique pour toute autre bactérie quelque soit leur état physiologique et leur stress. Nous considèrerons donc qu'un certain pourcentage de réduction du colorant correspond à un certain nombre de bactéries d'une manière générale.

En parallèle, nous avons également effectué des dosages d'ATP pouvant rendre compte de l'effet de l'encapsulation sur le métabolisme énergétique des cellules. Le pourcentage d'ATP produit par les bactéries pourra ainsi être corrélé avec la technique Alamar Blue.

Grâce à ces différentes méthodes (numération sur boîtes, Alamar Blue et ATP-métrie), nous pourrons ainsi déterminer le nombre de cellules viables au sein des gels et le stress lié à l'encapsulation.

II. Etude de la viabilité des cellules dans les matrices

Afin de mieux comprendre l'effet de l'encapsulation sur les bactéries magnétotactiques dans les gels, nous avons choisi dans un premier temps d'étudier la viabilité des cellules non magnétiques. Les bactéries ont alors été piégées dans des gels de silice sur 15 jours. Le nombre de cellules viables est déterminé directement après encapsulation à t=0 (après 15 min en réalité) puis au bout de 1, 7 et 15 jours. Le comportement des bactéries a également été suivi dans les gels conçus avec une suspension de magnétite de 10 nm à 5 g/l en présence ou en absence d'un champ magnétique statique de 80 mT et dans des matrices de silice exposées au champ. L'objectif était de déterminer l'influence des nanoparticules de magnétite et du champ magnétique extérieur sur le comportement des cellules dans les gels.

A. Viabilité des bactéries encapsulées sans magnétosomes

1. Numération sur boîtes

La viabilité des bactéries non magnétiques encapsulées dans les différents gels au cours du temps, est représentée en pourcentage de CFU/ml directement après encapsulation (t = 0) puis au bout de 1, 7 et 15 jours (Fig. 27). Le pourcentage de bactéries au cours du temps a été déduit de la référence (100 %) qui correspond au nombre de bactéries dans la suspension bactérienne (SB) avant l'encapsulation.

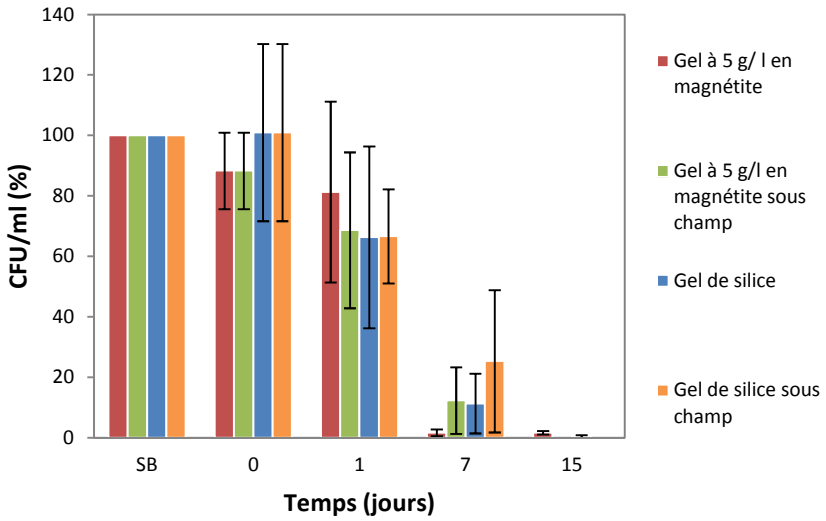


Figure 27 : Pourcentage de CFU/ml des bactéries non magnétiques encapsulées dans des gels à différentes concentrations en magnétite, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation. A 15 jours, pas de données en présence de champ.

Directement après encapsulation à t=0, 88 % (+/-13 %) et 101 % (+/- 29 %) des bactéries restent viables cultivables dans les gels conçus à partir de magnétite à 5 g/l (représentés en rouge) et les gels de silice (représenté en bleu). A t=0, les matrices ne sont pas exposées au champ magnétique. La détermination du taux de bactéries se réalise au bout de 15 min après gélification et donne une information sur le stress lié à l'encapsulation. Sur les 15 jours d'encapsulation, le nombre de bactéries diminue pour tous les gels. Dans le gel à 5 g/l en magnétite, les taux de bactéries viables cultivables sont de 81 % (+/- 30 %) au bout d' 1 jour et de 2 % (+/- 1 %) au bout de 7 et 15 jours. En ce qui concerne les gels contenant de la magnétite et exposés au champ (représenté en vert), la diminution est telle que l'on passe de 69 % (+/-26 %) à 12 % (+/-11 %) entre 1 et 7 jours. Dans les gels de silice, les bactéries subissent également le même stress et passent de 66 (+/- 30 %) à 11 % (+/- 9 %) puis 0 % au bout d'1, 7 et 15 jours. La présence d'un champ (en orange) semble également provoquer une diminution drastique de la proportion de bactéries cultivables qui vont passer de 67 % (+/- 16 %) à 25 % (+/- 24 %) entre 1 et 7 jours.

Directement après encapsulation, les bactéries ne semblent pas subir de stress important. Toutefois entre 7 et 15 jours, les bactéries semblent très affectées. Comme nous avons pu remarquer, les écarts-types sont très importants et la diminution du nombre de CFU/ml au cours du temps est très importante, ce qui suggère un stress conséquent des bactéries encapsulées dans toutes les conditions d'encapsulation. Il existe une hypothèse qui pourrait expliquer ces résultats. Il se pourrait que les bactéries stressées dans le gel deviennent viables non cultivables après redispersion du gel. Ce nombre de bactéries viables non cultivables peut également être très variable si l'on tient compte du fait que les cellules ont été encapsulées en phase stationnaire (état

physiologique différent) et que la redispersion des gels est plus difficile lors de leurs vieillissements, ce qui pourrait donc empêcher les bactéries de se diviser sur boîtes de Pétri (Fig. 28). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé des tests de viabilité par la méthode Alamar Blue.

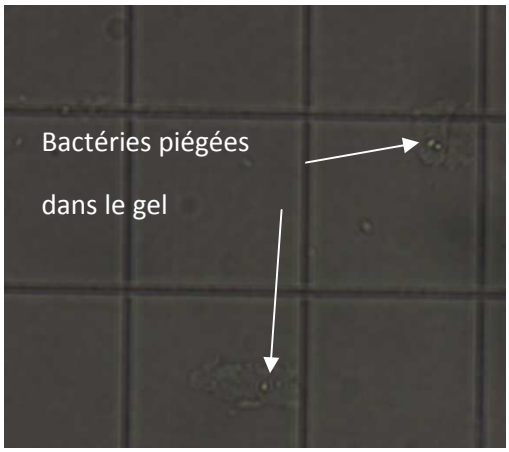


Figure 28 : Bactéries piégées dans des agrégats de gel après redispersion des matrices

2. Alamar blue

La viabilité des bactéries sans magnétosomes a été déterminée sur 15 jours d'encapsulation dans des gels de silice et des matrices conçues à partir d'une suspension de magnétite de 10 nm à 5 g/l. Le suivi a été réalisé en présence ou non d'un champ magnétique extérieur. La référence est associée à la suspension bactérienne avant l'encapsulation et correspond à 100 % des cellules/ml.

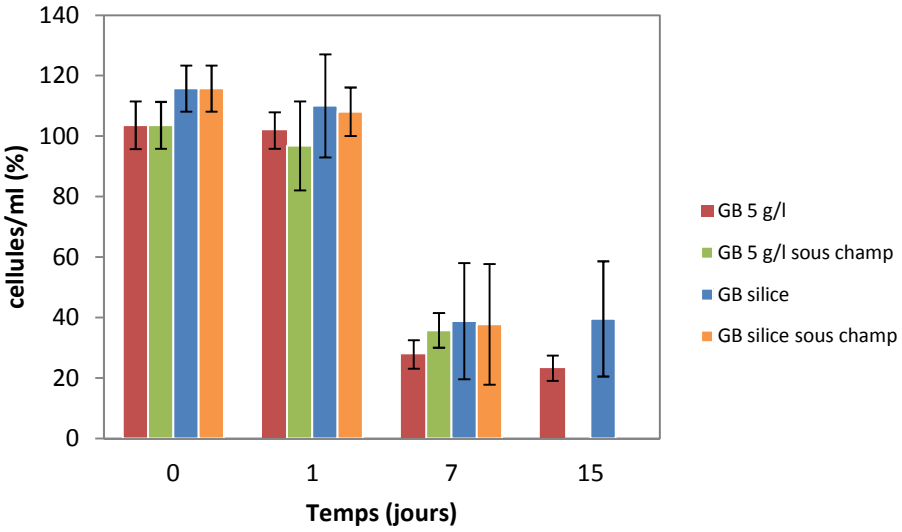


Figure 29 : Viabilité des AMB-1 sans magnétosomes dans les gels de silice en présence d'un champ (orange), en absence de champ (bleu) et dans les matrices conçues avec une suspension de magnétite à 5 g/l en présence d'un champ (vert) et en absence de champ (rouge), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation. A 15 jours, pas de données en présence de champ.

Le pourcentage de bactéries viables a été déterminé en supposant que l'activité respiratoire des bactéries reste constante au cours du temps comme pour les *E.coli*. Dans ce cas, la droite standard préalablement déterminée pour les *Escherichia coli* peut être appliquée pour quantifier le nombre de bactéries magnétotactiques viables. De plus, directement après l'encapsulation des AMB-1 à t=0, l'équation de droite corrélant le nombre de CFU/ml au pourcentage de réduction de la résazurine était identique à celle obtenue pour les *E.coli*. Ces résultats suggérent que l'activité respiratoire pourrait être étendue pour n'importe quel type de cellules en aérobiose, ce qui n'est pas le cas pour la production d'ATP qui peut légèrement évoluer en fonction de l'état physiologique et du type de cellules ainsi que du stress.

Nous pouvons remarquer que dans les différentes conditions entre 0 et 1 jour, les bactéries ne subissent pas de stress de l'encapsulation (Fig. 29). Puis entre 7 et 15 jours, nous pouvons observer une diminution du nombre de bactéries. A 7 jours, le pourcentage de bactéries viables dans les gels contenant de la magnétite s'élève à 28 % en absence d'un champ (en rouge) et 36 % pour la matrice exposée au champ magnétique (en vert). Pour les gels de silice exposés (en orange) et non exposés au champ (en bleu), 39 % des bactéries restent viables. A 15 jours, les tests ont seulement été réalisés sur des matrices non exposées au champ magnétique. Nous pouvons observer une légère diminution du pourcentage de bactéries dans le gel contenant de la magnétite tandis que dans le gel de silice, le nombre de bactéries reste constant. Nous pouvons remarquer que les bactéries subissent un stress au cours du vieillissement du gel entre 7 et 15 jours. La présence de magnétite dans les gels (matrices magnétiques) n'influence pas la viabilité des bactéries encapsulées. Nous pouvons également constater qu'un champ magnétique statique appliqué sur les gels magnétiques et non magnétiques n'affecte pas les cellules. Ces résultats concordent bien avec les tests de viabilité réalisés sur les *E.coli*.

En ce qui concerne la variabilité des résultats (écarts-types importants) pour les bactéries piégées dans les gels de silice au bout de 7 et 15 jours, il se pourrait qu'il y ait soit une division cellulaire, soit des modifications dans l'activité respiratoire. Les tests Alamar Blue permettant d'exclure les problèmes liés à la redispersion du gel, une division cellulaire ou bien des changements dans l'activité respiratoire des cellules (peut-être en raison des états physiologiques différents) pourraient expliquer le problème de reproductibilité. Une augmentation du nombre de bactéries entrainerait une hausse du pourcentage de réduction de la résazurine. Si l'on considère qu'il n'y a pas de division cellulaire, une modulation de l'activité respiratoire entraînerait une diminution ou une augmentation du pourcentage de réduction de la résazurine. Les deux hypothèses sont tout autant plausibles. Les pores des gels étant assez hétérogènes et macroporeux, il est donc possible que le nombre de bactéries en division diffère d'une expérience à l'autre. Au bout de 7 jours, les gels

contenaient parfois des fractures qui pourraient s'expliquer suite aux dégagements gazeux liés aux bactéries métaboliquement actives (Fig. 30).



Figure 30 : Fracture d'un gel de silice après 7 jours d'encapsulation qui pourrait être due à un dégagement gazeux des bactéries encapsulées

D'une manière générale, nous avons pu remarquer que les résultats étaient plus reproductibles avec la technique Alamar Blue que pour les comptages sur boîtes. Ces observations confortent l'hypothèse selon laquelle une partie des bactéries entrerait dans un état viable non cultivable après 1 jour d'encapsulation.

3. Dosage de l'ATP

La quantité d'ATP extraite des cellules (exprimée en pourcentage) a été déterminée au cours du temps puis corrélée au pourcentage de viabilité obtenu par les tests Alamar Blue. La référence à 100 % correspond au nombre de bactéries dans le gel directement après l'encapsulation à t=0. L'ATP dosé pour les bactéries en suspension avant l'encapsulation étant relativement variable et parfois différent des quantités extraites dans les gels à t=0, nous avons donc décidé de s'affranchir de ces variations en déterminant le pourcentage d'ATP extrait seulement dans les gels où les bactéries vont subir le même stress.

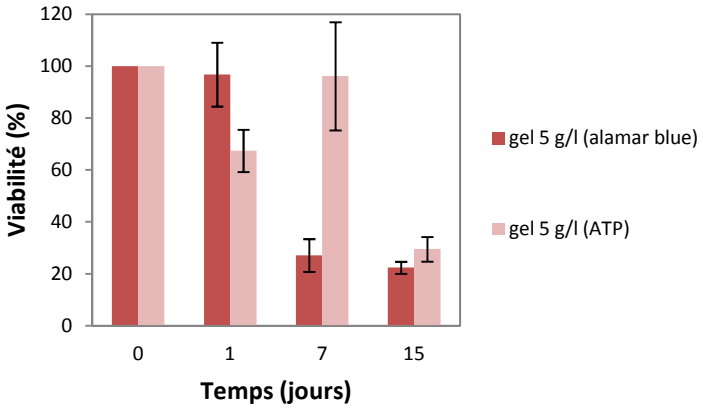


Figure 31 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l déterminée par le test Alamar Blue (en rouge) et par dosage d'ATP (en rose), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Après un jour d'encapsulation dans les gels magnétiques, le pourcentage d'ATP (représenté en rose) diminue par rapport au nombre de bactéries déterminé par le test Alamar Blue (représenté en rouge) (Fig. 31). Puis nous pouvons observer une augmentation de la quantité d'ATP par rapport au nombre de cellules après 7 jours d'encapsulation. Et enfin après 15 jours d'encapsulation, la quantité d'ATP diminue et se trouve légèrement supérieure au pourcentage de cellules viables.

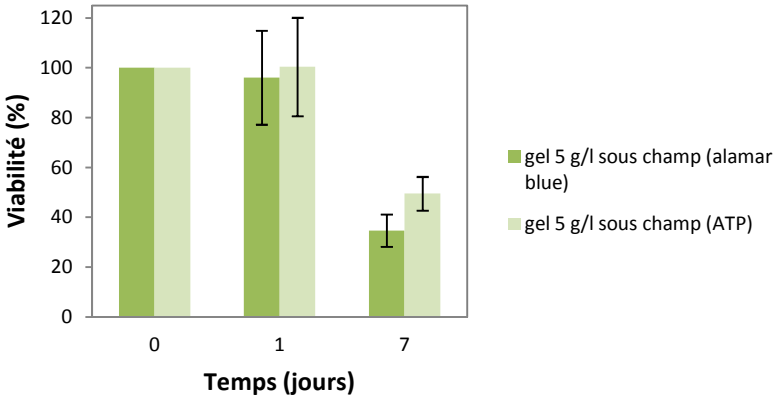


Figure 32 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l sous champ déterminée par le test alamar blue (en vert) et par dosage d'ATP (en vert clair), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1 et 7 jours d'encapsulation

En présence d'un champ magnétique, le pourcentage d'ATP (vert clair) corrobore avec le pourcentage de viabilité (vert foncé) au bout d'1 jour (Fig. 32). Puis nous pouvons observer une légère augmentation du pourcentage d'ATP au bout de 7 jours. Toutefois les écarts-types nous montrent que la quantité d'énergie dosée peut corroborer ou bien dépasser le pourcentage de cellules viables. La présence d'un champ magnétique semblerait influencer légèrement la production d'ATP au bout de 7 jours. Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus pour les gels non exposés

au champ magnétique (Fig. 31), nous constatons une différence remarquable à 7 jours où la quantité d'ATP est très largement supérieure en absence d'un champ.

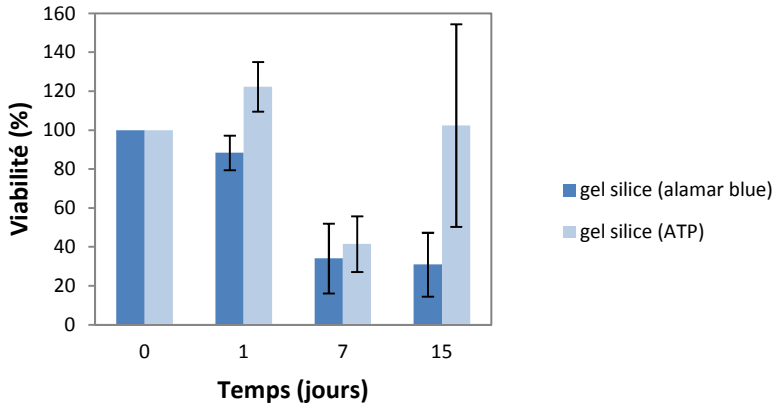


Figure 33 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice déterminée par le test alamar blue (en bleu foncé) et par dosage d'ATP (en bleu clair), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Pour les bactéries encapsulées dans les matrices de silice, nous constatons qu'au bout d' 1 jour d'encapsulation, le pourcentage d'ATP dosé est plus important (bleu clair) par rapport au pourcentage de bactéries viables (bleu foncé) (Fig. 33). A 7 jours, la quantité d'énergie coïncide bien avec le pourcentage de cellules viables. Au bout de 15 jours, les résultats sont difficilement interprétables en raison des écarts-types très importants. Nous pouvons cependant remarquer qu'à partir de 24h d'encapsulation, le pourcentage d'ATP extrait commence à augmenter.

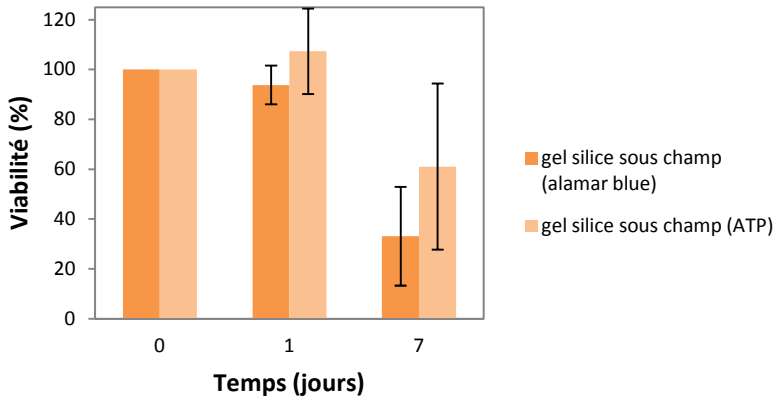


Figure 34 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les gels de silice déterminée par le test alamar blue (en orange) et par dosage d'ATP (en orange clair), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1 et 7 jours d'encapsulation

Au bout d'1 jour d'encapsulation des bactéries dans les gels de silice exposés au champ magnétique, le pourcentage d'ATP (représenté en orange clair) est supérieur au pourcentage de bactéries viables (représenté en orange) (Fig. 34). Il en est de même pour les valeurs obtenues au

bout de 7 jours. Les écart-types montrent cependant que d'une expérience à une autre la quantité d'ATP corrobore avec le nombre de cellules ou bien donne des indications supérieures.

Tous les résultats obtenus dans les différents gels, nous permettent de voir qu'il se produit un phénomène entre 1 et 7 jours d'encapsulation. Au bout de 24h, on observe une concentration en ATP plus marquée seulement dans les gels de silice en absence d'un champ magnétique. Au bout de 7 jours, le pourcentage d'ATP augmente fortement pour le gel magnétique par rapport au nombre de cellules tandis qu'en présence d'un champ, il n'augmente que très légèrement. Cependant, il est particulièrement difficile de déceler un éventuel impact du champ magnétique étant données les incertitudes élevées de certaines mesures. De plus, les quantités d'ATP mesurées en présence d'un champ sont généralement moins importantes que celles en absence d'un champ. Ces observations suggèrent donc que l'effet du champ n'est peut-être visible que pour des temps de mesures différents.

Bien que les dosages d'ATP soient difficilement reproductibles en raison de sa dégradation (hydrolyse) rapide à température ambiante et des conditions de dosage qui doivent être réalisées exactement de la même manière lors de chaque mesure, nous pouvons cependant voir une tendance qui coïncide souvent avec le pourcentage de viabilité. Parmi tous les résultats obtenus, les quantités d'ATP dosé sont supérieures ou égales à ce qui est attendu à partir du pourcentage de bactéries viables, ce qui confirme que les cellules préservent leur activité métabolique dans les gels.

4. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet la visualisation de la surface d'un échantillon en trois dimensions. Par le biais de cette technique, il est alors possible de voir comment les bactéries sont intégrées dans le gel et notamment leur forme en spirille. Comme les bactéries sont piégées dans la matrice, nous pouvons seulement observer celles qui ressortent du gel. Les observations sont faites au bout de 24h pour les bactéries encapsulées dans la matrice de silice (Fig. 35) et le gel magnétique (Fig. 36). Comme nous pouvons remarquer sur les photos, les bactéries sont bien dispersées dans les matrices.

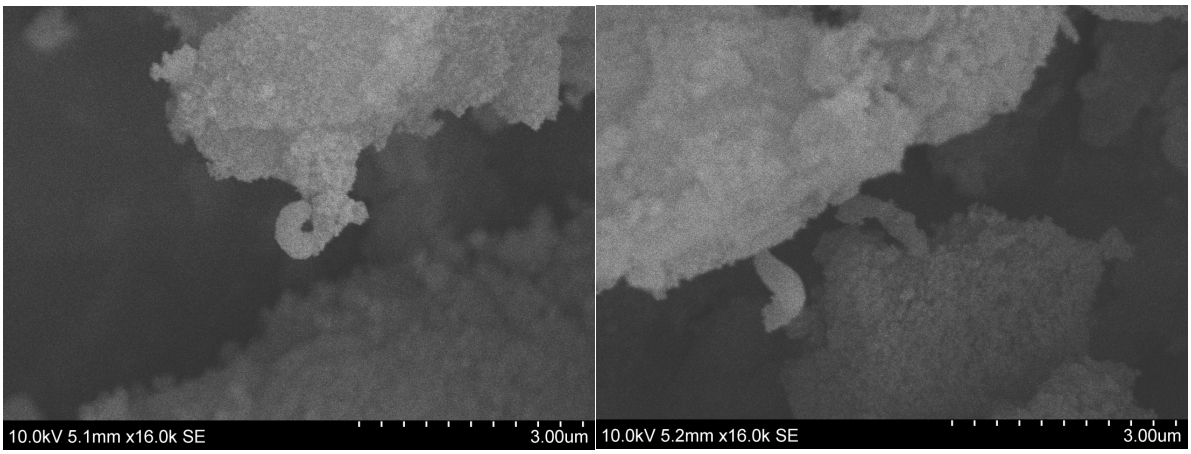


Figure 35 : Clichés MEB des bactéries sans magnétosomes encapsulées dans le gel de silice au bout de 24h

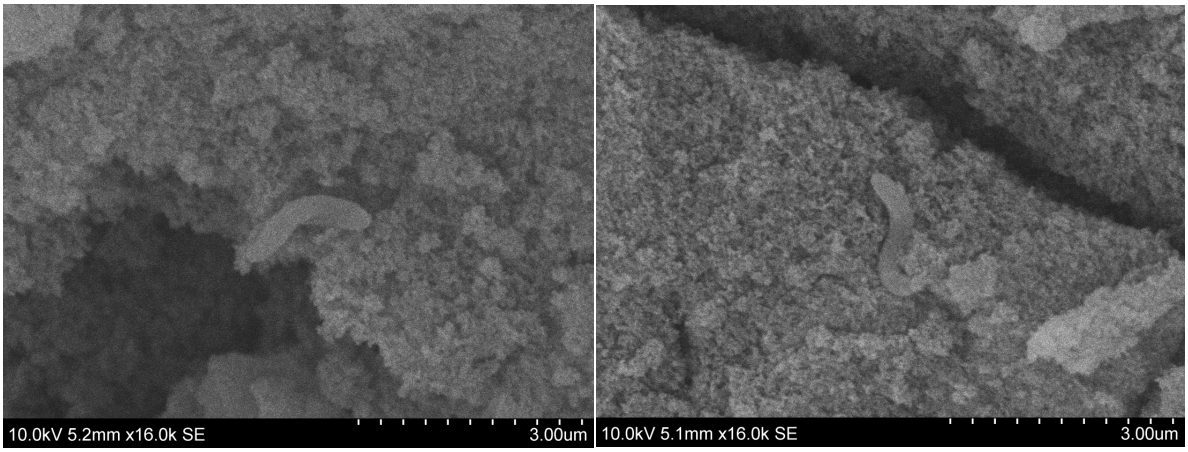


Figure 36: Clichés MEB des bactéries sans magnétosomes encapsulées dans le gel de silice contenant de la magnétite au bout de 24h

Nous pouvons constater que l'aspect du gel est différent lorsque celui-ci contient des nanoparticules de magnétite. Toutefois il est difficile de savoir si cette différence est liée au séchage ou aux nanoparticules magnétiques.

B. Viabilité des bactéries encapsulées avec des magnétosomes

L'étude du comportement des bactéries avec des magnétosomes dans les matrices de silice a été réalisée en présence et en absence d'un champ. Nous avons pu voir précédemment que les gels de silice avec des nanoparticules de magnétite n'influençaient pas la viabilité des cellules sans magnétosomes c'est pourquoi il ne nous a pas semblé utile d'encapsuler les cellules magnétiques dans ce type de matrice. En effet, l'objectif principal était de voir l'effet du champ magnétique. Nous nous sommes donc intéressés par la suite qu'aux matrices de silice exposées ou non au champ

magnétique extérieur. Les expériences ont été menées exactement de la même manière que pour les cellules non magnétiques.

1. Numération sur boîtes

Comme les cellules contiennent des magnétosomes, celles-ci sont sensibles au champ magnétique et peuvent donc s'aligner et se diriger vers un champ. En général, les extractions des cellules immobilisées se font par destruction et resuspension du gel dans du tampon phosphate puis le gel resuspendu est placé sous agitation magnétique pendant 1h. Etant donné que les bactéries contiennent des magnétosomes, il était préférable de ne pas ajouter d'aimant lors de la resuspension des gels. En effet, comme nous pouvons le voir sur la photo (Fig. 37), les bactéries restent collées à l'aimant ce qui pourrait conduire à une sous-estimation du nombre de bactéries viables dans les gels.



Figure 37 : Bactéries avec des magnétosomes collées à un aimant

Suite à ces observations, nous avons donc décidé d'extraire les bactéries des gels au moyen de billes de verre de 4 mm sous agitation. Un premier test nous a permis de déterminer le temps d'agitation suffisant pour ne pas détruire les cellules. Au bout de 15 min et 30 min d'agitation, la viabilité des cellules restait identique tandis qu'à 45 min, elle diminuait très légèrement. Afin de garder les cellules vivantes, celles-ci ont alors été resuspendues avec des billes pendant un temps de 15 min.

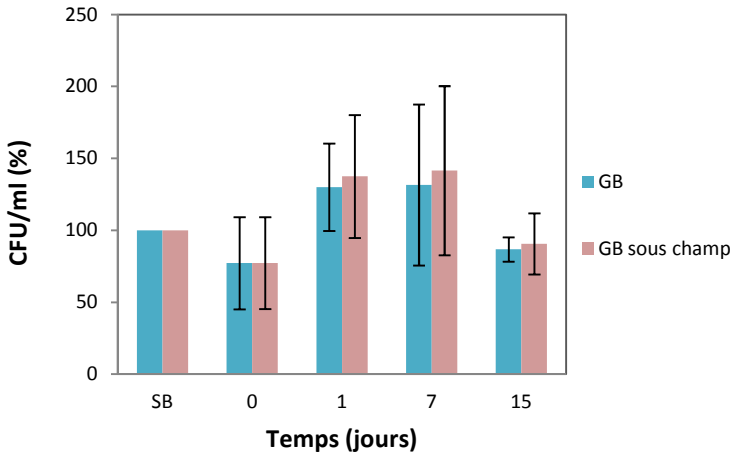


Figure 38 : Pourcentage de CFU/ml des bactéries magnétiques encapsulées dans des gels de silice en présence (en rose) et en absence (en bleu) d'un champ magnétique, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Le graphique ci-dessus (Fig. 38), nous montre l'évolution du nombre de CFU/ml (en pourcentage) au cours du temps pour les bactéries encapsulées dans les gels de silice en présence (en rose) et en absence (en bleu) d'un champ magnétique statique. La référence à 100 % correspond au nombre de bactéries dans la suspension initiale avant l'encapsulation. Nous pouvons voir que directement après l'encapsulation à t=0, le nombre de bactéries viables cultivables diminue à 77 % puis à 1 et 7 jours, le nombre de CFU/ml augmente à 130 et 142 % pour les cellules exposées ou non au champ statique. Et enfin à 15 jours, le pourcentage de cellules décroît et passe à 90 %. Que ce soit en présence ou en absence d'un champ, le comportement des bactéries dans les matrices est identique. Cependant, les écarts-types nous montrent que l'augmentation du nombre de CFU/ml n'est pas significative et qu'il n'y a donc pas de variations notables. L'absence d'une diminution du nombre de bactéries au cours du temps nous laisse suggérer que la numération sur boîtes n'est pas une méthode adaptée pour les bactéries magnétotactiques. Cette hypothèse pourra donc être confirmée lors des tests de viabilité grâce à la méthode Alamar Blue.

2. Alamar blue

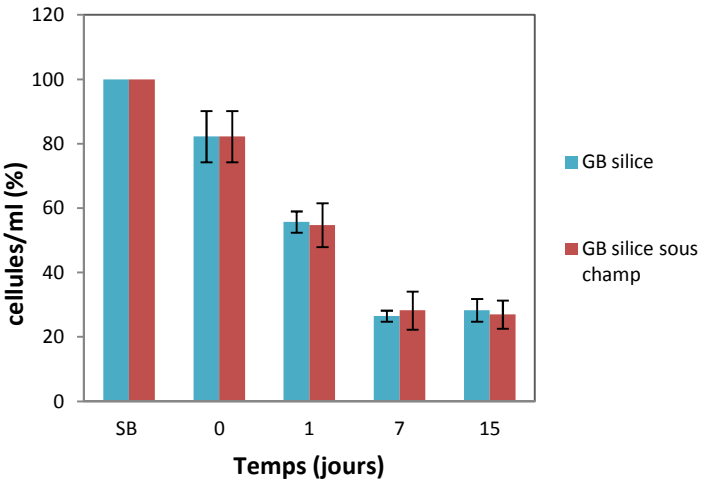


Figure 39 : Pourcentage de cellules viables dans les gels en présence (en rouge) et en absence (en bleu) d'un champ, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Les pourcentages de cellules viables dans les gels en présence (en rouge) et en absence (en bleu) d'un champ statique diminuent au cours du temps de manière reproductible (Fig. 39). Ces résultats ne concordent pas avec les comptages sur boîtes. Nous pouvons remarquer que la méthode Alamar Blue est bien adaptée sur des cellules avec des magnétosomes en raison des faibles écarts-types qui montrent qu'il n'y a pas de division cellulaire. Directement après l'encapsulation, les bactéries subissent un stress et 82 % des cellules restent viables. Puis au bout d' 1 jour, le taux de bactéries diminue de moitié en présence et en absence d'un champ magnétique. Entre 7 et 15 jours, nous pouvons observer une stabilisation des pourcentages de viabilité à 28 %. Ces résultats nous montrent que les bactéries ne sont pas affectées par le champ magnétique statique malgré la présence des magnétosomes.

3. Dosage de l'ATP

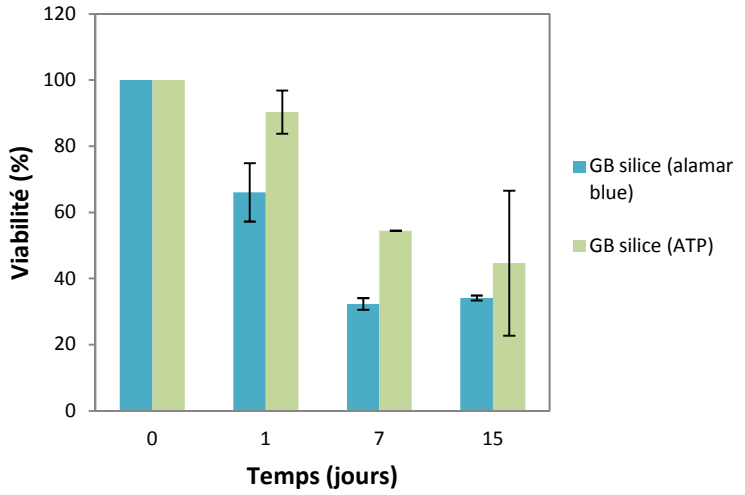


Figure 40 : Viabilité des bactéries avec magnétosomes encapsulées dans les gels de silice déterminée par la technique Alamar Blue (en bleu) et le dosage d'ATP (en vert), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Lors de cette expérience, nous avons cherché à déterminer s'il y avait une corrélation entre le pourcentage de cellules viables obtenu par la méthode Alamar Blue (en bleu) et le pourcentage d'ATP dosé (en vert) pour les bactéries avec des magnétosomes encapsulées dans les gels de silice en absence d'un champ (Fig. 40). La valeur à 100 % à t=0 correspond à la référence c'est-à-dire à la quantité d'ATP dosée pour les gels directement après l'encapsulation. Les pourcentages d'ATP estimés dans les suspensions initiales avant l'encapsulation étaient identiques à ceux obtenus pour les gels à t=0 pour chaque expérience. Les cellules magnétiques encapsulées pendant 15 jours restent viables dans les gels. Les pourcentages d'ATP (en vert) sont supérieurs au pourcentage de bactéries viables (en bleu) pour chaque temps d'encapsulation. Toutefois, les écarts-types sont assez importants et peuvent atteindre 45 % pour le gel à 15 jours. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces variations : l'extraction et le dosage d'ATP et l'état physiologique des cellules. L'extraction et le dosage d'ATP sont des techniques très délicates et très sensibles. D'après les résultats, le pourcentage d'ATP dans chaque échantillon diminue au cours du temps et suit donc le pourcentage de viabilité déterminé par le test Alamar Blue. Malgré l'importance des écart-types, on peut suggérer que, d'après les pourcentages d'ATP mesurés, il pourrait y avoir une surproduction d'énergie par les cellules dans les gels. Ces résultats confirment bien que les bactéries sont viables dans les gels et que leur activité métabolique est préservée.

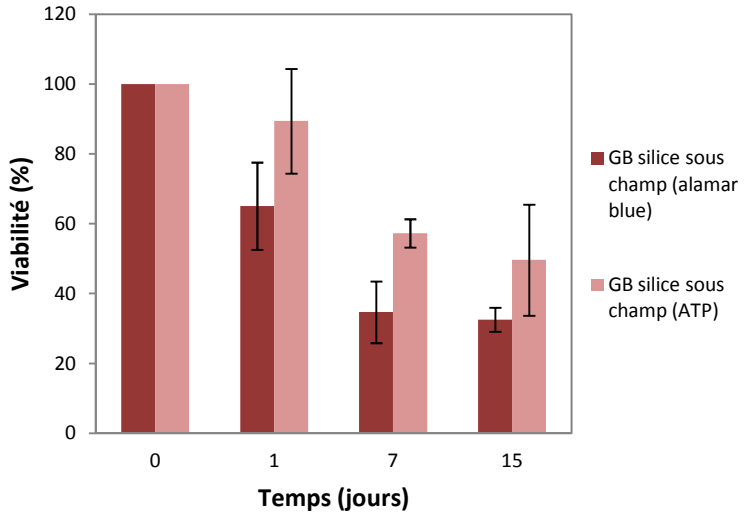


Figure 41 : Viabilité des bactéries avec magnétosomes encapsulées dans les gels de silice déterminée par la technique alamar blue (en rouge) et le dosage d'ATP (en rose), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Les pourcentages d'ATP déterminés pour les gels en présence d'un champ magnétique (en rose) diminuent au cours du temps et suivent les valeurs obtenues pour les tests de viabilité par la méthode Alamar Blue (en rouge) (Fig. 41). Toutefois, la quantité d'énergie extraite reste largement supérieure au nombre de cellules viables (indiqué en rouge par le test Alamar Blue), ce qui montre une éventuelle surproduction d'ATP par les cellules encapsulées et une activité métabolique préservée. Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus en absence d'un champ magnétique (Fig. 40), nous pouvons constater que le champ n'influence pas la production d'ATP car celle-ci est tout aussi importante dans les gels non exposés au champ.

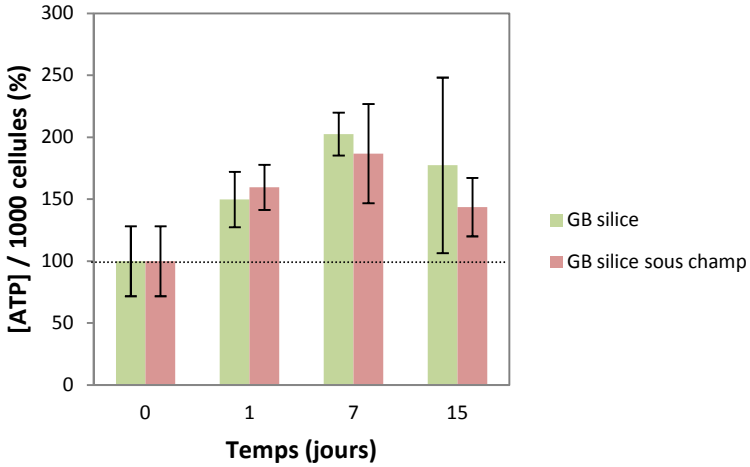


Figure 42 : Production d'ATP en pourcentage pour les cellules encapsulées dans les gels de silice en présence (en rose) et en absence d'un champ magnétique (en vert), immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation

Afin de mieux percevoir l'effet de l'encapsulation et du champ magnétique, la concentration d'ATP dosé a été reportée au nombre de cellules quantifié par la méthode Alamar Blue. La concentration brute en ATP exprimée en nM a ainsi été divisée par le nombre de bactéries puis déterminée pour 1000 cellules en pM. Cette quantité d'ATP produite a ensuite été retranscrite en pourcentage par rapport à la référence de départ juste après encapsulation. Ainsi nous pourrons directement voir si la production moyenne d'ATP par bactérie est constante au cours du temps. Nous pouvons remarquer qu'entre 1 et 7 jours, les bactéries produisent plus d'ATP et qu'au bout de 7 jours, la surproduction est plus importante (Fig. 42). La présence d'un champ magnétique ne semble pas affecter significativement la production d'ATP. Ainsi une surproduction d'ATP pourrait être directement liée à l'effet de l'encapsulation et d'un éventuel stress osmotique lié à la présence de sels au sein des matrices.

4. Viabilité des bactéries magnétiques et non magnétiques dans les gels de silice

Afin de mieux comprendre le comportement des bactéries contenant des magnétosomes, nous avons comparé les taux de viabilité (déterminés par les tests Alamar Blue) avec ceux des cellules non magnétiques (Fig. 43). Les bactéries immobilisées dans la silice ont été exposées ou non à un champ magnétique statique. Les pourcentages de viabilité ont été déduits à partir de la référence à 100 % correspondant au nombre de bactéries présentes initialement dans la suspension avant l'encapsulation.

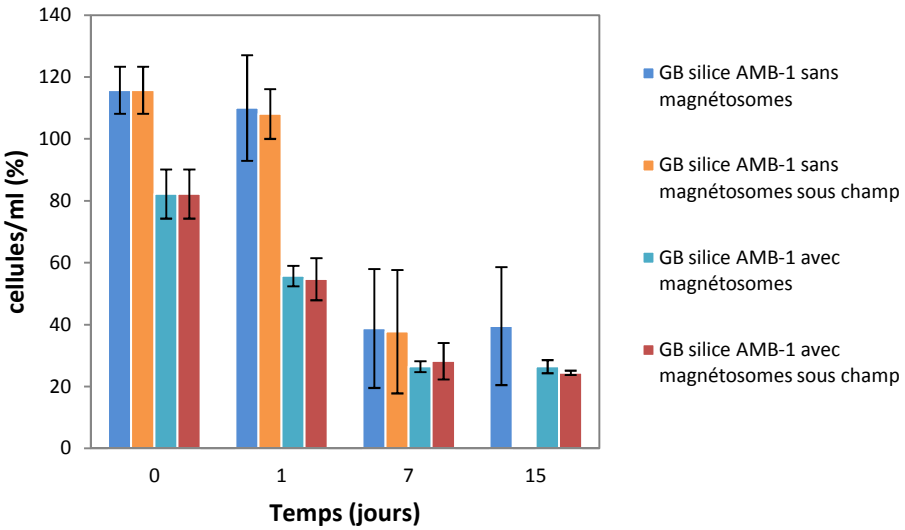


Figure 43 : Viabilité des bactéries avec et sans magnétosomes encapsulées dans les gels de silice en présence et en absence d'un champ, immédiatement après encapsulation (t=0), puis après 1, 7 et 15 jours d'encapsulation (pas de données à 15 jours sous champ avec des bactéries sans magnétosomes (en orange))

Nous pouvons remarquer que quel que soit le type de cellule (avec ou sans des magnétosomes), la viabilité diminue au cours du vieillissement du gel. Le champ magnétique ne semble pas affecter la viabilité des cellules. Par contre, nous pouvons constater que les bactéries possédant des magnétosomes sont plus sensibles à l'encapsulation que celles qui n'en contiennent pas. En effet, directement après l'encapsulation (t=0), le nombre de cellules magnétiques diminue à 80 % puis au bout de 1 jour le nombre de bactéries diminue de 20 % alors que les cellules sans magnétosomes ne sont pas affectées. Au bout de 7 et 15 jours, le pourcentage de bactéries viables reste constant pour les deux types de cellules. On observe qu'il y a 40 % (+/- 20 %) de cellules vivantes sans magnétosomes et environ 27 % (+/- 6 %) de bactéries avec des magnétosomes. La sensibilité plus marquée des bactéries avec magnétosomes par rapport aux cellules non magnétiques pourrait être corrélée à une surproduction d'ATP entre 1 et 7 jours (Fig. 42).

5. Microscopie Electronique en Transmission (MET)

a) *Bactéries encapsulées dans la matrice à 5 g/l en magnétite*

Les bactéries encaspulées pendant 24h dans les matrices magnétiques, présentent une bonne intégrité membranaire. Les agrégats de magnétite sont dispersés dans le gel et le réseau de silice ne se trouve pas en contact direct avec les bactéries probablement en raison du glycérol autour des cellules (Fig. 44). Les chaines de magnétosomes sont particulièrement difficiles à observer. En effet, il est très délicat de visualiser les bactéries en coupe le long de l'axe longitudinal et celles-ci se trouvent généralement coupées transversalement laissant apparaitre seulement un magnétosome (Fig. 45).

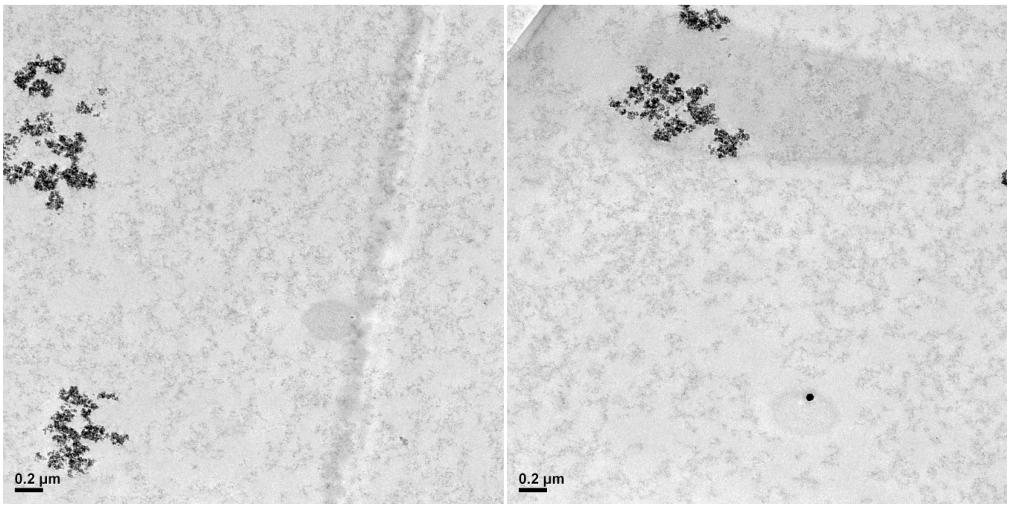


Figure 44 : Cliché MET des bactéries avec magnétosomes dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l au bout de 24h

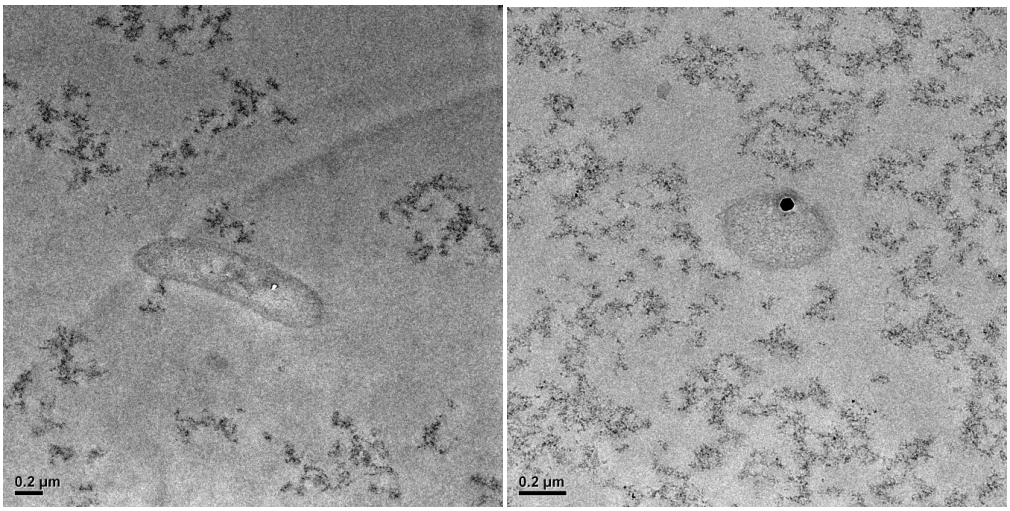


Figure 45 : Cliché MET des bactéries avec magnétosomes dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l au bout de 24h

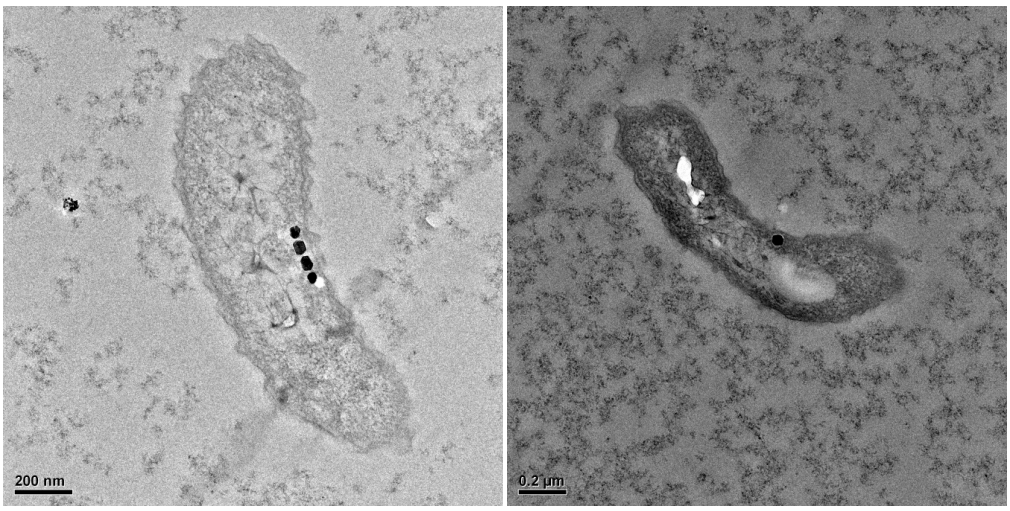


Figure 46 : Cliché MET des bactéries avec magnétosomes dans les gels conçus avec une suspension de magnétite à 5 g/l au bout de 24h

Malgré les difficultés, nous avons réussi à trouver deux bactéries coupées sur l'axe longitudinal et faisant apparaitre des magnétosomes (Fig. 46). Une analyse a permis de déterminer la taille moyenne des magnétosomes entre 40 et 50 nm, ceux ci étant espacés de la membrane plasmique de 34 nm environ. La distance entre chaque magnétosome était de 7 nm et correspond à l'épaisseur des deux membranes de magnétosomes.

b) *Bactéries encapsulées dans la matrice de silice*

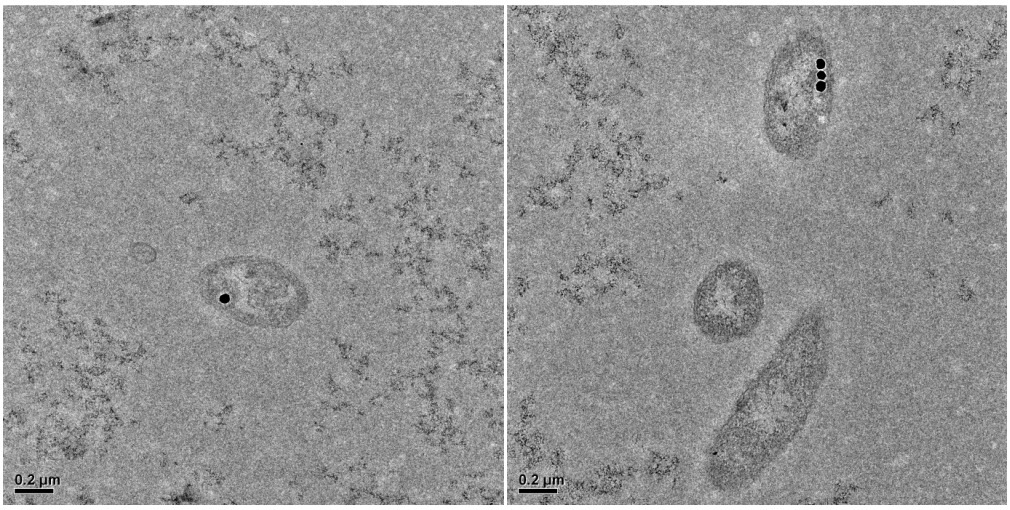


Figure 47 : Cliché MET des bactéries avec magnétosomes dans les gels de silice au bout de 24h

Les bactéries piégées dans les matrices de silice durant 24h se présentaient de la même manière que celles immobilisées dans les gels à base d'oxyde de fer (Fig. 47).

6. Observations au MEB des AMB-1 avec magnétosomes encapsulées dans les gels

Les bactéries piégées dans les matrices ont été observées au MEB afin de déterminer l'état de dispersion des cellules et la structure du gel (Fig. 48). Nous pouvons remarquer que la surface externe des bactéries se présente sous l'aspect de plissures.

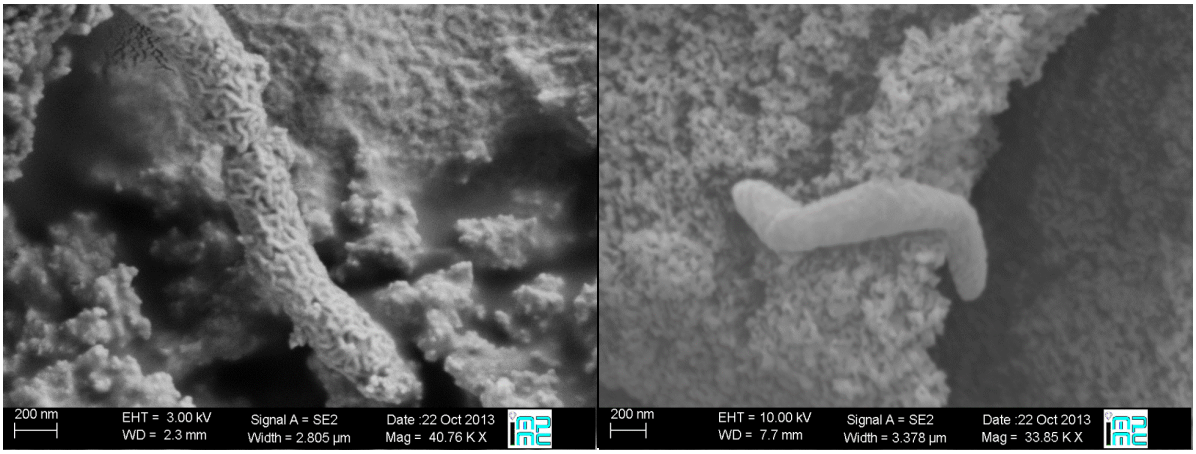


Figure 48 : Clichés MEB des bactéries piégées dans les gels de silice au bout de 24h

C. Détection des magnétosomes par VSM

La détection des magnétosomes par mesures magnétiques est particulièrement intéressante afin d'étudier les propriétés magnétiques des particules biogéniques contenues dans des cellules dispersées dans une matrice. En effet, les chaînes de magnétosomes agrégées présentent des interactions magnétostatiques fortes, ce qui pourrait conduire à des modifications dans les valeurs du champ coercitif. La dispersion des bactéries dans la matrice de silice pourrait donc contribuer à modifier les propriétés magnétiques.

1. Mesures magnétiques au VSM

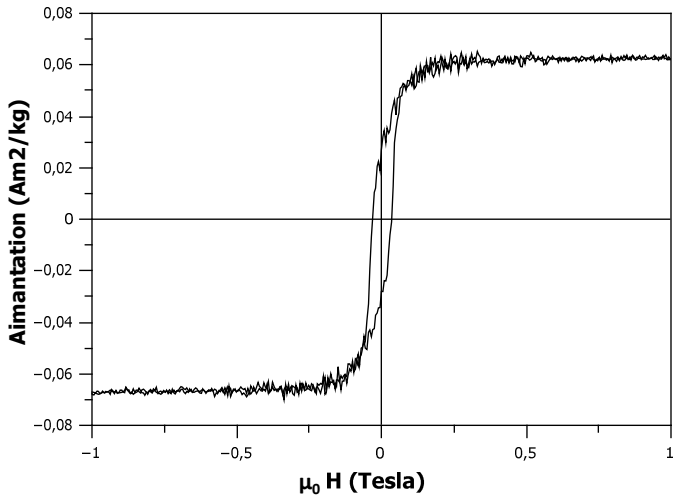


Figure 49 : Courbe d'aimantation des bactéries avec magnétosomes encapsulées dans les gels de silice à 300 K

D'après la courbe d'aimantation déterminée pour les AMB-1 encapsulées dans les gels de silice (Fig. 49), les valeurs de Ms et Mr sont de 0,065 et 0,027 Am^2/kg. Ces valeurs d'aimantation sont très faibles dans les gels en raison de la faible concentration en bactéries soit 7.10^8 cellules/ml environ. C'est pourquoi nous pouvons seulement comparer le rapport Mr/Ms avec ceux obtenus dans la littérature (tableau 1). La courbe d'aimantation présente une hystérèse importante caractéristique des particules monodomaines stables. Les valeurs de Hcr, Hc et Hcr/Hc ont été également comparées avec celles issues de l'article de Li *et al.,* 2009[b] (tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des valeurs de Mr/Ms, Hcr, Hc et Hcr/Hc

	Mr/Ms	Hcr	Hc	Hcr/Hc
AMB-1 encapsulées	0,40	37,0 (+/- 0,7)	33,0 (+/- 0,7)	1,1
AMB-1 *	0,46	23,3 (+/-0,5)	18,6 (+/- 0,4)	1,3
Magnétosomes extraits des AMB-1 *	0,33	18,2 (+/- 0,4)	12,2 (+/- 0,2)	1,5

* Résultats issus de la publication : Li *et al.,* 2009[b]. A comparative study of magnetic properties between whole cells and isolated magnetosomes of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1

Le rapport Mr/Ms dans les gels est particulièrement très proche de celui obtenu pour les cellules non encapsulées selon Li *et al.,* 2009[b]. Ce rapport diminue pour les magnétosomes isolés en raison des interactions magnétostatiques. Nous pouvons constater une différence importante dans les valeurs de Hcr et Hc qui sont plus élevées dans les gels que pour les bactéries non dispersées et les magnétosomes isolés. D'après Li *et al.,* 2009[b], ces valeurs diminueraient lorsque les chaînes de magnétosomes se collapsent et qu'il se produit une augmentation des interactions magnétostatiques entre les magnétosomes. Ainsi, des bactéries bien dispersées dans la matrice conduiraient à une diminution des interactions inter-bactéries et intra-chaines. Toutefois, étant donné que les conditions de culture utilisées dans l'article de Li *et al.,* 2009[b] sont différentes des nôtres, il aurait été particulièrement intéressant de comparer les bactéries encapsulées avec des cellules non dispersées issues de la même culture pour pouvoir avoir plus de certitudes sur les résultats obtenus.

2. Mesures magnétiques au SQUID

a) *Courbe d'aimantation*

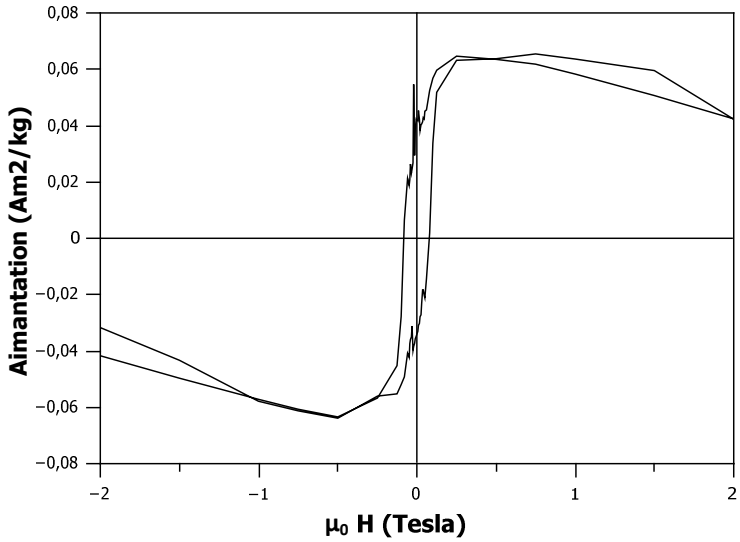


Figure 50 : Courbe d'aimantation des bactéries avec magnétosomes encapsulées dans les gels de silice à 10 K

A 10 K, la courbe d'aimantation se présente différemment. Nous pouvons remarquer que l'aimantation à saturation est influencée par le diamagnétisme de la silice (Fig. 50). En effet, l'aimantation à saturation tend à diminuer lorsque le champ appliqué augmente en valeur absolue au delà de 0,5 T. Les valeurs de Ms et Mr sont de 0,064 et 0,034 Am^2/kg. Le rapport Mr/Ms s'élève à 0,5

et se rapproche de celui obtenu à température ambiante (0,4). On observe également une augmentation de Hc à 75,5 mT.

b) *Mesures FC-ZFC en champ fort (2,5 T)*

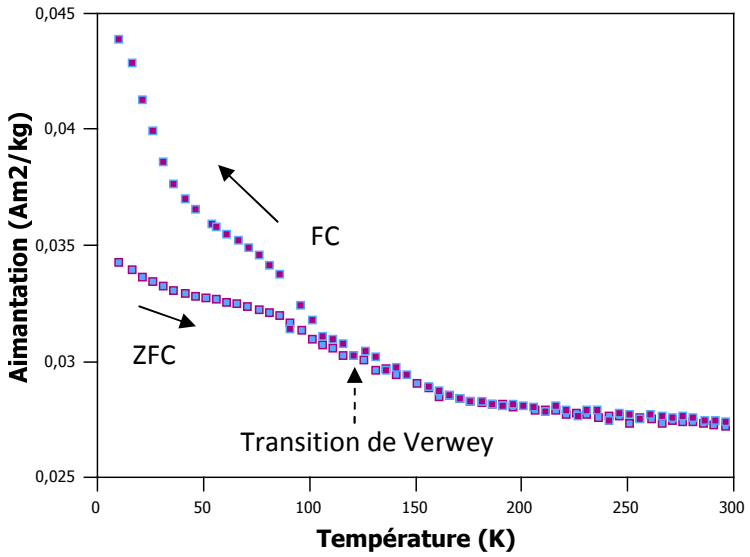


Figure 51 : Courbes FC (Field Cooling) et ZFC (Zero Field Cooling) de l'aimantation en fonction de la température pour les bactéries avec magnétosomes encapsulées dans le gel de silice (en champ fort à 2,5 T)

Pour les mesures FC-ZFC en champ fort (2,5 T), l'échantillon est d'abord refroidi en absence d'un champ jusqu'à 10 K (Fig. 51). On applique ensuite un champ de 2,5 T et on le coupe à 10 K pendant un certain temps. Des mesures d'aimantation rémanente sont alors effectuées pendant la montée en température jusqu'à 300 K. On applique ensuite un champ de 2,5 T à 300 K puis on effectue des mesures d'aimantation rémanente pendant le refroidissement. Par cette méthode, il est alors possible de déterminer la transition de Verwey qui se trouve au croisement des deux courbes FC-ZFC à 120 K.

c) *Mesures FC-ZFC en champ faible (50 Oe)*

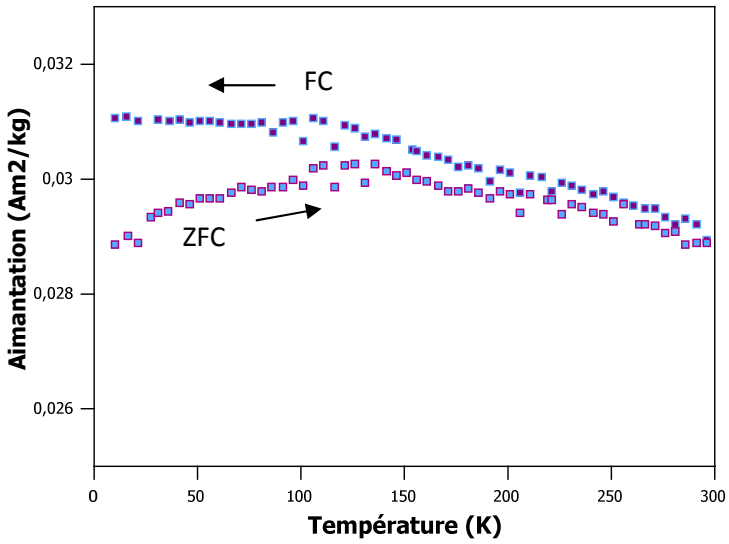


Figure 52 : Courbes FC-ZFC de l'aimantation en fonction de la température pour les bactéries avec magnétosomes encapsulées dans le gel de silice (en champ faible à 50 Oe)

Les courbes FC-ZFC en champ faible (50 Oe) pour les bactéries encapsulées dans les gels de silice, ne se rejoignent pas à 300 K, ce qui suggère que les magnétosomes sont des grains monodomaines stables (Fig. 52). La température de blocage, au croisement des deux courbes se trouve donc au delà de 300 K.

d) *Mesure d'aimantation rémanente isotherme*

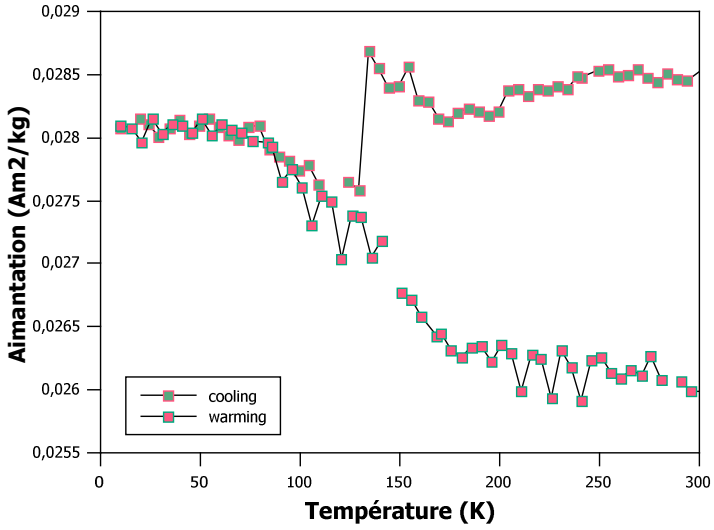


Figure 53 : Isotherme d'aimantation rémanente (Room Temperature Saturation Isothermal Remanent Magnetization RTSIRM) pour les bactéries avec magnétosomes encapsulées dans le gel de silice

Les mesures d'aimantation rémanente isotherme se réalisent en appliquant un champ de 2,5 T sur l'échantillon à 300 K (Fig. 53). Le champ est ensuite coupé et des mesures d'aimantation

rémanente sont effectuées au cours du refroidissement de l'échantillon jusqu'à 10 K (courbe nommée cooling). La rémanence acquise à une température fixe s'appelle aimantation rémanente isotherme. Arrivé à 10 K, on mesure l'aimantation rémanente en réchauffant l'échantillon jusqu'à 300 K (courbe warming). Vers 120 K, la courbe obtenue en refroidissant décroit brutalement. Il s'agit de la transition de Verwey. L'analyse montre que les particules peuvent enregistrer une aimantation rémanente à température ambiante. Il s'agit donc de nanoparticules monodomaines stables. Puis une partie de l'aimantation rémanente est perdue. La structure cristallographique de la magnétite passe de cubique face centrée (cfc) à monoclinique. A 300 K, l'écart entre les deux courbes montre une perte de mémoire qui est la signature de la magnétite.

D. Conclusion

Nous avons montré au cours de ce chapitre que, comme dans le cas des *E.coli,* les gels préparés étaient cytocompatibles pour les bactéries magnétotactiques. Les tests réalisés par numération sur boîtes de Pétri, ont montré qu'une partie des bactéries étaient viables non cultivables lorsqu'elles étaient encapsulées sans magnétosomes, ce qui nous laisse donc entrevoir les limites de cette méthode sur des bactéries magnétotactiques. Les expériences menées par les tests Alamar Blue et par ATP-métrie nous ont permis de constater que l'activité métabolique des cellules était préservée dans les gels et qu'il n'y avait pas d'effet visible du champ magnétique statique sur les bactéries magnétotactiques aux temps des mesures (à 1, 7 et 15 jours). Nous avons pu constater que les bactéries avec des magnétosomes encapsulées dans les matrices de silice étaient plus sensibles à l'encapsulation que celles sans magnétosomes. De plus, les cellules magnétiques augmentaient leur production d'ATP intracellulaire entre 1 et 7 jours d'encapsulation en présence et en absence d'un champ magnétique, ce qui pourrait résulter d'un stress plus important et d'une adaptation du métabolisme en conséquence. Le comportement des bactéries immobilisées dans les matrices de silice dépend donc du type de cellule (avec ou sans magnétosomes). L'influence du champ magnétique sur la production d'ATP n'a pas pu être démontrée sur les bactéries magnétotactiques contrairement aux *Escherichia coli* qui produisaient plus d'ATP au bout de 24h lorsqu'elles étaient exposées au champ. Les mesures magnétiques effectuées sur des gels de silice avec des bactéries contenant des magnétosomes, nous ont permis de voir l'effet de la dispersion des cellules qui pourrait conduire à des modifications des propriétés magnétiques en modulant les valeurs du champ coercitif. Nous avons également pu déterminer l'état monodomaine des particules biogéniques avec une transition de Verwey à 120 K et une température de blocage située au-delà de 300 K.

III. Bilan

Au cours de ce chapitre, nous avons montré que deux nouvelles méthodes d'étude de viabilité, les tests Alamar Blue et l'ATP-métrie, peuvent être appliquées sur différents types de bactéries encapsulées dans des matrices minérales. Ces techniques pourraient à l'avenir servir pour déterminer la viabilité de bactéries extrêmophiles ou viables non cultivables piégées dans des gels. Nous avons constaté que la survie des bactéries immobilisées dans les matrices dépendait du type et de l'état physiologique des cellules. Ainsi, les *E.coli* encapsulées au cours de la phase exponentielle de croissance, survivent mieux sur le long terme (entre 7 et 15 jours) que les bactéries magnétotactiques encapsulées en phase stationnaire. Cette étude a montré que, dans tous les cas, le champ magnétique n'avait pas d'impact sur la survie des cellules encapsulées dans les matrices de silice. D'un point de vue biochimique (production d'ATP), nous n'avons pas pu démontrer qu'un champ magnétique statique de 80 mT pouvait influencer le métabolisme des cellules sauf dans le cas des *E.coli* au bout d'1 jour d'encapsulation. Toutefois, d'autres phénomènes pourraient intervenir tels que la production de protéines « heat shock » impliquées dans la réparation de l'ADN (Chow *et al.,* 2000), l'expression de gènes *rpoS*, l'augmentation de l'activité de la deshydrogénase (Filipic *et al.,* 2012) ou bien même une augmentation de l'influx de calcium intracellulaire (Lyle *et al.,* 1997). Dans le cas des bactéries magnétotactiques, il serait d'ailleurs très intéressant d'étudier l'effet du champ sur l'influx de fer intracellulaire. Il existe donc une multitude d'effets potentiels positifs ou négatifs qui pourraient se produire sans affecter la viabilité des cellules si celles-ci gèrent le stress lié à l'application du champ. Une étude plus approfondie permettrait à l'avenir de déceler d'éventuelles modifications au niveau biochimique.

Après avoir démontré que les matrices non magnétiques (à base de silice) et magnétiques (à base de silice et nanoparticules d'oxyde de fer) étaient cytocompatibles et que les bactéries encapsulées préservaient leur activité métabolique, nous avons pu étudier les phénomènes de biominéralisation de bactéries encapsulées qui sont décrits dans le chapitre suivant.

Chapitre IV – Effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation

Chapitre IV – Effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation 176

I. Procédé d'encapsulation des bactéries pour la production des magnétosomes 176

A. Protocole pour l'encapsulation des bactéries 176

B. Suivi des processus de biominéralisation 182

II. Etude sur les processus de biominéralisation 190

A. Viabilité des bactéries dans les gels et les suspensions contrôles pour l'étude des processus de biominéralisation 190

B. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées sans magnétosomes 192

C. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées avec des magnétosomes 209

D. Effet des matrices à base de nanoparticules de magnétite monodomaines sur les processus de biominéralisation 219

III. Bilan 226

Chapitre IV : Effet du champ magnétique sur les processus de biominéralisation

Dans le chapitre précédent, nous avons pu voir que les différentes matrices étaient cytocompatibles pour les bactéries magnétotactiques. Ces matériaux sont donc propices pour les études de biominéralisation.

La biominéralisation chez les organismes vivants est un processus biologiquement contrôlé et la formation des minéraux biogéniques se distingue significativement des caractéristiques minéralogiques d'origine abiotique. Lorsque certains être vivants constitués de coquille ou de squelette vont mourir, leur structure minérale va alors se déposer dans les sédiments et dans les profondeurs des océans. Ainsi ces minéraux sont responsables de l'empreinte fossile de la Terre. Par conséquent, les études sur les processus de biominéralisation constituent une thématique très interdisciplinaire à l'interface entre la vie et la Terre et axée sur les trois domaines de la biologie, de la chimie et de la géologie, communément appelée biogéochimie (Leadbeater & Riding, 1986).

A l'heure actuelle, le processus de formation des magnétosomes chez les bactéries magnétotactiques n'est pas totalement élucidé et le déroulement des étapes de la biominéralisation reste encore incertain. Le choix de cette thématique constitue donc une voie vers une meilleure compréhension d'un modèle de biominéralisation avec formation de minéraux magnétiques. L'impact d'un champ magnétique pourrait nous conduire indirectement vers une meilleure compréhension des processus de biominéralisation et susciter ainsi de nouvelles hypothèses et perspectives d'études encore non explorées sur cette thématique. Dans un premier temps, nous verrons le procédé d'encapsulation des bactéries dans des conditions adaptées pour la production de magnétosomes puis nous étudierons l'effet du champ magnétique sur la biominéralisation.

I. Procédé d'encapsulation des bactéries pour la production des magnétosomes

A. Protocole pour l'encapsulation des bactéries

1. Mise en culture des bactéries avant l'encapsulation

Dans un premier temps, nous avons fait le choix d'étudier les phénomènes de biominéralisation sur des bactéries initialement introduites dans des gels sans magnétosomes afin de

mieux percevoir les effets de l'encapsulation et de l'application d'un champ magnétique sur la production des magnétosomes.

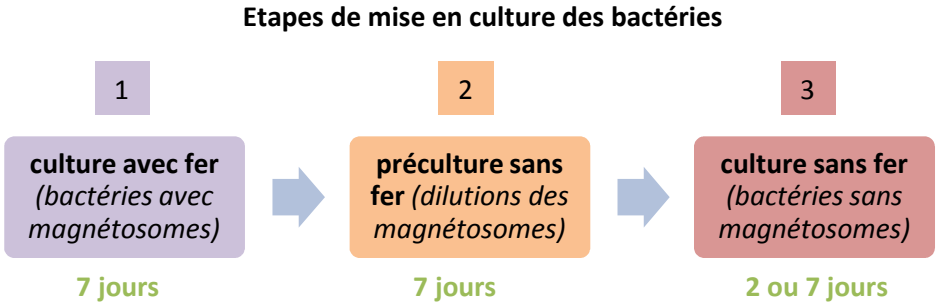


Figure 1 : Protocole de mise en culture des bactéries sans magnétosomes

La mise en culture des bactéries s'effectue en trois temps (Fig. 1). Lors de la première étape, une préculture de bactéries magnétiques (avec des magnétosomes) est inoculée dans un nouveau milieu riche en fer (20 µM de quinate de fer) pour permettre la production de magnétosomes pendant 7 jours à 30°C. L'étape suivante consiste à repiquer les bactéries de la première culture dans un autre milieu privé de quinate de fer afin de récupérer des cellules avec moins de magnétosomes et de les habituer à un milieu pauvre en fer. Cette préculture est incubée pendant 7 jours à 30°C sous agitation à 130 rpm. Enfin lors de la dernière étape, les bactéries issues de la préculture de l'étape 2 sont repiquées de nouveau dans un milieu pauvre en fer afin d'obtenir un maximum de cellules non magnétiques. La culture est incubée pendant 2 ou 7 jours à 30°C sous agitation à 130 rpm.

2. Choix du milieu de culture pour la préparation des suspensions bactériennes avant l'encapsulation

L'étude des processus de biominéralisation nécessite d'encapsuler les bactéries avec leur milieu de culture et une source de fer pour permettre la précipitation de la magnétite intracellulaire. Le choix du milieu de culture lors de la resuspension des bactéries avant l'encapsulation a suscité quelques questions. Etait-il plus judicieux de resuspendre les bactéries dans un milieu plus concentré pour éviter la dilution des différents constituants dans le gel ou bien la suspension bactérienne devait elle être préparée sans concentrer le milieu de culture qui serait alors dilué dans le gel ? Nous avons alors testé les deux milieux de culture afin de déterminer les conditions les plus adaptées pour permettre la production de magnétosomes dans les gels. Les concentrations en fer ont été ajustées à 60 µM et 300 µM (une dilution dans le gel conduit à une concentration de 20 µM et 100 µM). Les bactéries encapsulées sont à une concentration de 7.10^8 cellules/ml alors que les bactéries en culture

peuvent atteindre des DO de 0,2 soit 2.10^8 cellules/ml environ. Cette différence de concentration en cellules dans le gel peut entrainer une consommation plus importante de fer, c'est pourquoi les quantités de fer ont été augmentées à un juste milieu pour être suffisamment importantes sans pour autant provoquer de stress pour les bactéries. En effet, une concentration trop élevée inhibe la croissance et favorise le stress chez les bactéries. Il a été démontré que les bactéries MSR-1 subissaient un stress à partir de 200 µM de fer (Schüler & Baeuerlein, 1996). Lorsque l'on resuspend le culot de bactéries AMB-1 dans le milieu de culture, la concentration en fer est donc de 300 µM mais le temps de résidence des cellules en suspension avant l'encapsulation est suffisamment faible pour ne pas affecter les bactéries. Lorsque le milieu de culture (non concentré au préalable) est dilué dans le gel, la concentration en sources carbonées diminue, ce qui pourrait limiter la division cellulaire.

Pour réaliser l'encapsulation pour le suivi de la biominéralisation, il était important de garder la même composition du milieu de culture car celui-ci contient tous les éléments nécessaires pour la production de magnétosomes. En effet, ce milieu est composé de minéraux, de vitamines dont la vitamine C qui joue le rôle d'anti-oxydant et de l'EDTA, un chélatant des métaux qui en faible concentration favorise la production des magnétosomes (Alphandery *et al.,* 2012).

3. Préparation de la suspension bactérienne et encapsulation des bactéries

Les bactéries cultivées pendant 2 et 7 jours sans fer sont centrifugées et resuspendues dans différents milieux de culture :

- Milieu concentré ou non avec 300 µM de fer (soit 100 µM dans le gel)
- Milieu concentré ou non avec 60 µM de fer (soit 20 µM dans le gel)

Les gels sont conçus selon le même protocole que pour les encapsulations réalisées lors des tests de viabilité sauf que les bactéries sont ajoutées avec leur milieu de culture plus ou moins concentré en fer avec 10 % de glycérol au lieu du tampon phosphate avec 10 % de glycérol (cf. Annexe 10) (Fig. 2).

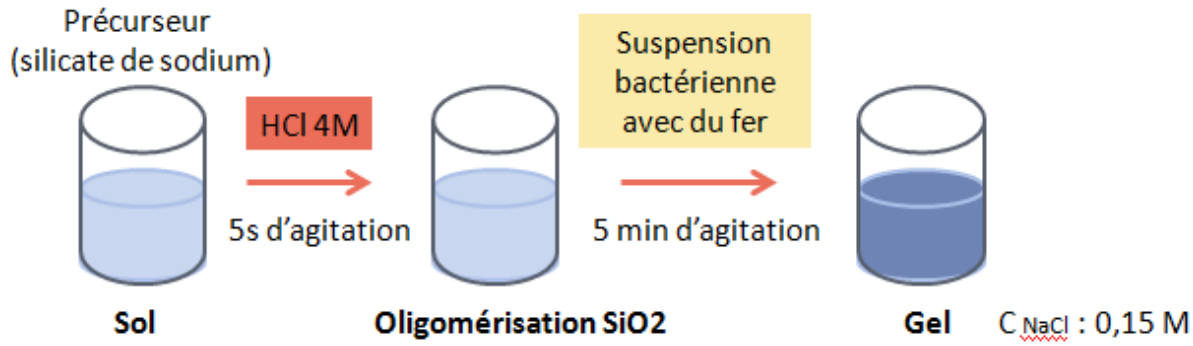


Figure 2 : Protocole d'encapsulation des bactéries dans les gels de silice pour l'étude des processus de biominéralisation

Le milieu de culture est alors dilué dans le gel lorsqu'il est mélangé au silicate de sodium. La concentration en fer passe donc de 60 µM à 20 µM ou bien de 300 µM à 100 µM. Après l'encapsulation des bactéries, les gels de silice sont exposés ou non à un champ magnétique statique pendant 7 jours.

4. Suivi de la consommation en oxygène dans les gels

Les bactéries peuvent seulement produire des magnétosomes en condition micro-oxique ou anoxique. Afin de déterminer à quel moment les conditions deviennent réductrices dans le gel, nous avons réalisé un suivi de la consommation en oxygène au moyen d'un colorant, la résazurine, de couleur bleue lorsqu'elle est oxydée, puis rose quand elle se réduit et incolore lorsqu'elle est totalement réduite. Les bactéries en suspension sont d'abord mises en contact avec le colorant qui va alors très vite devenir rose en raison de la concentration cellulaire importante qui commence à réduire le milieu. Directement après l'encapsulation des cellules, le gel devient totalement rose (Fig. 3).



Figure 3 : Photo du gel directement après l'encapsulation des bactéries

Afin de voir l'effet du volume de gel contribuant à augmenter ou diminuer l'espace d'air au dessus de la matrice (volume mort), nous avons réalisé différents gels avec un volume de 3 ml et 6 ml dans un pilulier de 9 ml. Entre 1 et 7 jours, tous les gels sont blancs avec une fine couche rose à l'interface gel-air. Les conditions deviennent micro-oxiques quelque soit le volume de gel (Fig. 4).

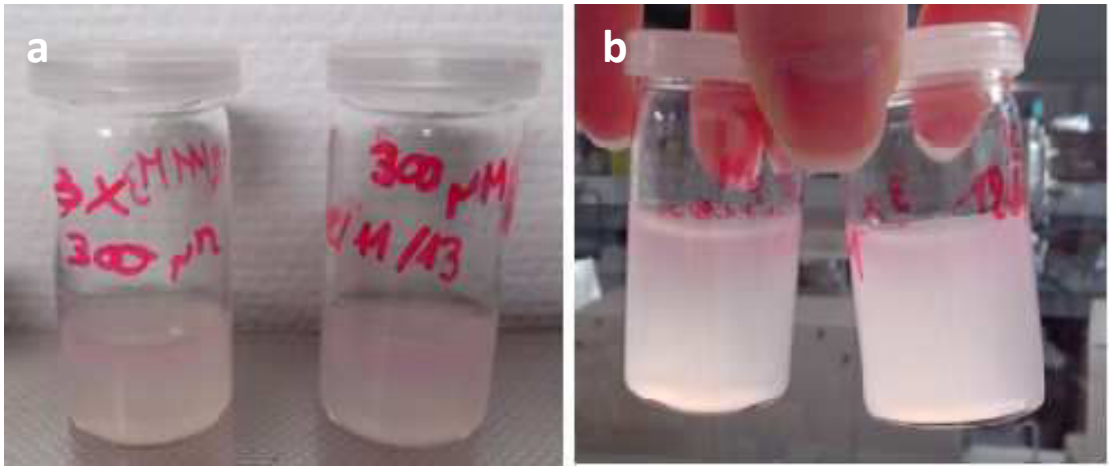


Figure 4 : Photos des gels bactériens de 3 ml (a) et 6 ml (b) au bout de 7 jours

Au bout de 13 jours, les gels sont dans des conditions réductrices et sont alors totalement blancs (Fig. 5).

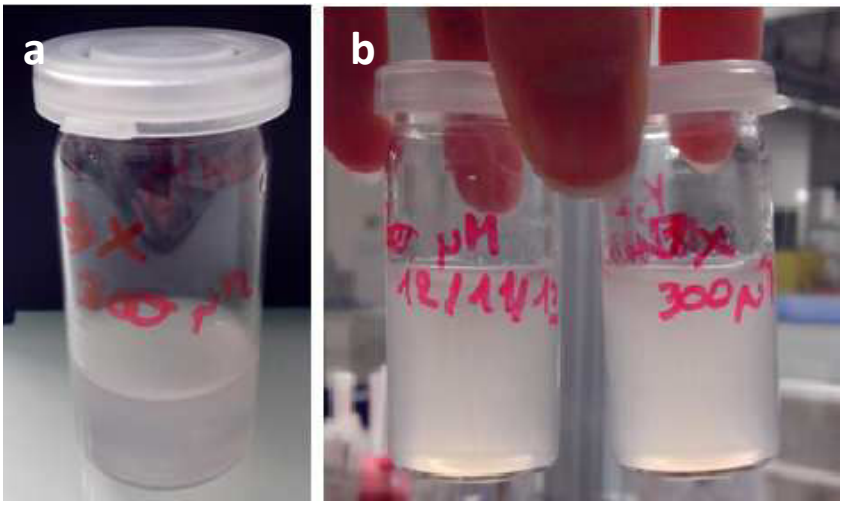


Figure 5 : Photos des gels bactériens de 3 ml (a) et 6 ml (b) au bout de 13 jours

Suite à ces observations, nous avons pu constater que les conditions étaient propices pour la production des magnétosomes et que les bactéries pouvaient donc être encapsulées sans nécessité de dégazer au préalable le milieu de culture pour obtenir des conditions micro-oxiques. La consommation d'oxygène par les bactéries va conduire naturellement à une micro-oxie.

5. Premiers tests préliminaires d'encapsulation des cultures de 7 jours

Les premières encapsulations ont été réalisées avec des cultures de 7 jours sans magnétosomes (comme pour les tests de viabilité effectués auparavant, présentés dans le chapitre 3).

Pour les observations en microscopie, les bactéries ont été resuspendues dans du tampon phosphate sous agitation avec des billes de verre (cf. Annexe 4). Les échantillons ont été conservés à -20°C avec 20 % de glycérol afin de préserver les cellules avant leur visualisation au microscope.

Les observations en microscopie électronique en transmission ont montré qu'environ 10% des bactéries contenues dans la suspension avant l'encapsulation possédaient des magnétosomes souvent de forme irrégulière, arrangés en chaines disloquées ou bien de forme homogène arrangés en chaines linéaires. Certaines bactéries possédaient parfois des granules de polyphosphate (vésicules très denses aux électrons souvent de forme sphérique). Après 7 jours d'encapsulation dans le milieu dilué dans le gel avec 100 µM de fer, aucune bactérie ne possédait de magnétosomes aussi bien en présence qu'en absence d'un champ magnétique.

Etant donné que les bactéries ne produisaient pas de magnétosomes dans les gels, nous avons alors resuspendu les cellules dans un milieu concentré afin de se rapprocher des conditions de culture au sein des gels. Cela permettrait ainsi de voir si l'absence de production des magnétosomes serait due à la dilution du milieu de culture dans les gels malgré un apport suffisant en fer. Les bactéries ont ainsi été resuspendues dans un milieu concentré 3 fois avec 300 µM de fer. Au bout de 7 jours d'encapsulation sous champ, aucune bactérie observée en microscopie ne contenait des magnétosomes.

La composition du milieu (dilué ou non dans le gel) ne semblait donc pas influencer la production des magnétosomes. L'apport en fer était suffisant et les conditions micro-oxiques exigées pour la synthèse des particules biogéniques étaient respectées. Nous avons donc supposé que l'âge de la culture avant l'encapsulation serait un critère important pour permettre la production des magnétosomes. Les bactéries cultivées pendant 7 jours ne semblent donc pas pouvoir produire de magnétosomes. C'est pourquoi les tests ont ensuite été menés sur des bactéries issues d'une culture de 2 jours afin de diminuer le stress et faciliter la production des magnétosomes. Après deux jours de culture, les bactéries se trouvent en fin de phase exponentielle voire au début de la phase stationnaire. Les conditions semblent donc propices pour permettre aux bactéries de produire à nouveau des magnétosomes. Les différentes expériences menées dans ces nouvelles conditions seront décrites dans la partie suivante.

B. Suivi des processus de biominéralisation

Les suspensions bactériennes préparées à partir des cultures de 2 jours serviront à la fois pour l'encapsulation mais aussi pour la préparation de nouvelles suspensions que l'on appellera "suspensions contrôles" dans la suite de ce chapitre.

1. Préparation des « suspensions contrôles » pour l'étude des phénomènes de biominéralisation en solution

Afin de comprendre l'effet de l'encapsulation sur la biominéralisation, des suspensions servant de contrôle ont été préparées en mélangeant une solution à 0,25 M de NaCl contenant 5 % de glycérol avec la suspension bactérienne (cf. Annexe 10). Le mélange ainsi obtenu contient la même concentration en sels que dans les gels (0,15 M) (Fig. 6). Ces suspensions contrôles sont également très intéressantes car elles nous permettent d'observer directement si les bactéries produisent des magnétosomes lorsque l'on place un aimant près du flacon. En effet, les bactéries contenant des magnétosomes vont se diriger vers l'aimant. Elles permettent également de déterminer quel est le milieu le plus propice pour la production des magnétosomes. Certaines suspensions ont été réalisées en ajoutant des sels et d'autres sans en ajouter afin de voir si un stress osmotique potentiel pourrait ralentir la production des magnétosomes.

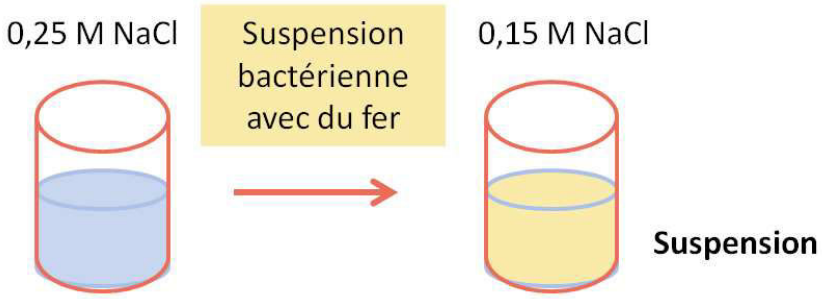


Figure 6 : Protocole de préparation des suspensions contrôles

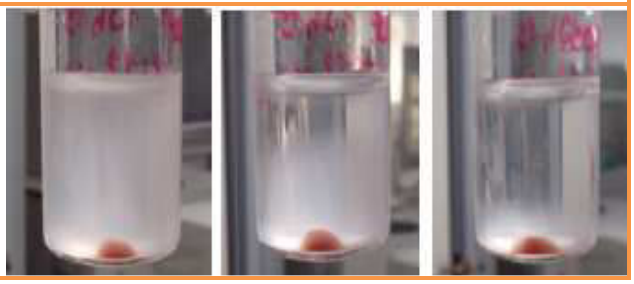
Les suspensions contrôles sont ensuite placées ou non sous un champ statique pendant 7 jours. Nous présenterons dans un premier temps les résultats obtenus pour les suspensions de bactéries afin de suivre la production des magnétosomes au cours du temps en fonction des différents milieux de culture utilisés (dilués et non dilués dans le gel avec 20 µM ou 100 µM de fer).

2. Observation macroscopique des suspensions contrôles

Les suspensions ont été préparées avec les milieux de culture concentrés avec 300 µM ou 60 µM de fer en présence et en absence de sels. Une autre suspension a également été préparée avec

un milieu de culture non concentré avec 300 µM de fer en présence et en absence de sels. Pour chaque condition, les suspensions ont été exposées ou non au champ magnétique statique pendant 7 jours. L'observation directe des suspensions et un test Alamar Blue au bout de 7 jours nous permettront de déterminer le milieu de culture pour lequel la production des magnétosomes sera favorisée ainsi que la viabilité des cellules.

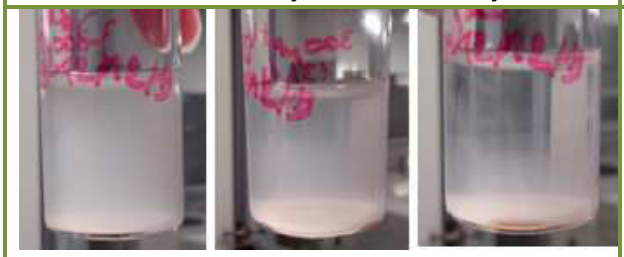
Tableau 1 : Observation des suspensions avec le milieu de culture dilué avec 100 µM de fer en présence et en absence d'un champ statique

Milieu dilué 100 µM fer					
Sans champ			Avec champ		
30 h	4 jours	7 jours	30 h	4 jours	7 jours
					

Les bactéries en suspension dans le milieu dilué avec 100 µM de fer en absence de sels NaCl, ont été observées au cours du temps (à 30h, 4 jours et 7 jours) (Tableau 1). Afin de mieux visualiser les bactéries ayant produit des magnétosomes, les suspensions non exposées au champ magnétique, ont été placées pendant 10 min près d'un aimant. Cette technique permet d'attirer seulement les bactéries magnétiques afin de faciliter leur visualisation.

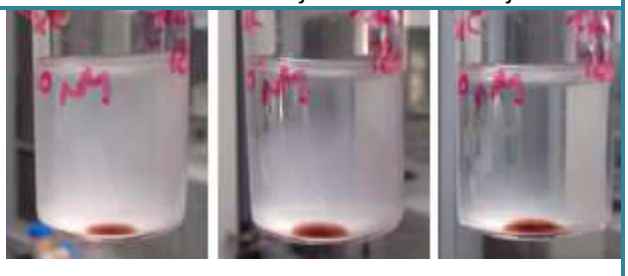
Après 30 h, très peu de bactéries possèdent des magnétosomes dans le flacon non exposé au champ (partie gauche) contrairement à la suspension exposée au champ (partie droite). Le culot de bactéries magnétiques augmente au cours du temps en présence d'un champ magnétique. En absence d'un champ, les bactéries ayant produit des magnétosomes sont en plus grand nombre au bout de 7 jours.

Tableau 2 : Observation des suspensions avec le milieu de culture dilué avec 100 µM de fer et 0,15 M de NaCl en présence et en absence d'un champ statique

Milieu dilué 100 µM fer + NaCl					
Sans champ			Avec champ		
30 h	4 jours	7 jours	30 h	4 jours	7 jours
					

En absence d'un champ dans les suspensions diluées avec 100 µM de fer en présence de sels, les bactéries semblent produire légèrement des magnétosomes au bout de 7 jours (Tableau 2). La production semble moins importante que pour les suspensions sans sels (Tableau 1). Au bout de 30h d'exposition au champ, les bactéries ne semblent pas produire de magnétosomes contrairement aux suspensions sans sels. Nous pouvons observer une légère production au bout de 4 jours, puis une augmentation du nombre de bactéries magnétiques au bout de 7 jours. Toutefois à 7 jours, le culot est plus clair que pour les cellules exposées au champ en absence de sels. En absence d'un champ, la quantité de bactéries ayant produit des magnétosomes est plus importante au bout de 7 jours par rapport aux suspensions après 30h et 4 jours. Nous pouvons donc constater que, indépendamment du champ magnétique, la présence de sels influence la production des magnétosomes dans les suspensions avec le milieu dilué supplémenté avec 100 µM de fer.

Tableau 3 : Observation des suspensions avec le milieu de culture non dilué avec 20 µM de fer en présence et en absence d'un champ statique

Milieu non dilué avec 20 µM fer					
Sans champ			Avec champ		
30 h	4 jours	7 jours	30 h	4 jours	7 jours
					

Au bout de 7 jours en absence d'un champ dans le milieu non dilué avec 20 µM de fer, le nombre de bactéries produisant des magnétosomes augmente (Tableau 3). En présence d'un champ,

la production de magnétosomes débute à partir de 30h et augmente au cours du temps jusqu'à des niveaux plus importants qu'en absence de champ.

Tableau 4 : Observation des suspensions avec le milieu de culture non dilué avec 20 µM de fer et 0,15 M de NaCl en présence et en absence d'un champ statique

Milieu non dilué avec 20 µM fer + NaCl					
Sans champ			Avec champ		
30 h	4 jours	7 jours	30 h	4 jours	7 jours
					

Pour le milieu non dilué avec 20 µM de fer en présence de sels, les résultats sont identiques à ceux obtenus en absence de sels (Tableau 4). Il semble donc que pour des milieux plus riches, la présence de sels n'influence pas la production des magnétosomes.

Tableau 5 : Observation des suspensions avec le milieu de culture non dilué avec 100 µM de fer et 0,15 M de NaCl en présence et en absence d'un champ statique

	Milieu non dilué avec 100 µM fer + NaCl				
	1 jour	2 jours	4 jours	7 jours	8 jours
Sous champ					
Sans champ					

Les bactéries en suspension dans un milieu non dilué avec 100 µM de fer en présence de sels, produisent des magnétosomes de la même manière que les cellules en suspension avec 20 µM de fer en présence de sels. La production des magnétosomes augmente au cours du temps en présence

d'un champ magnétique (Tableau 5). Les culots sont toutefois plus petits car le volume de suspension est de 3 ml au lieu de 6 ml comme pour les expériences précédentes. Un tableau récapitulatif de toutes les expériences est présenté ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats

	Milieu non dilué avec 100 µM fer + NaCl	Milieu non dilué avec 20 µM fer	Milieu non dilué avec 20 µM fer + NaCl	Milieu dilué avec 100 µM fer	Milieu dilué avec 100 µM fer + NaCl
30h sous champ	- Légère augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes				- Pas d'augmentation visible du nombre de bactéries produisant des magnétosomes
4 jours sous champ	- Augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes			-Légère augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes	- Légère augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes (vitesse de production ralentie par rapport à la suspension sans sels)
7 jours sous champ	- Augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes				- Augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes - Moins de bactéries semblent avoir produit des magnétosomes par rapport au milieu sans sels
Remarques générales	▪ La présence de sels pour le milieu dilué avec 100 µM de fer semble ralentir la production des magnétosomes ▪ Au bout de 7 jours **sans** champ : augmentation du nombre de bactéries produisant des magnétosomes. ▪ Les milieux les plus concentrés sont les plus adaptés pour la production de magnétosomes.				

En parallèle de ces observations macroscopiques, nous avons réalisé des études de viabilité afin de mieux percevoir les effets du champ magnétique et de la composition du milieu sur des bactéries en suspension. Les tests de viabilité ont été réalisés au moyen de la méthode Alamar Blue sur des suspensions de 7 jours exposées ou non au champ magnétique.

3. Viabilité des bactéries dans les suspensions contrôles

Le suivi de la viabilité des bactéries a été effectué sur 7 jours pour des suspensions contrôles contenant du milieu de culture non dilué avec 20 µM de fer.

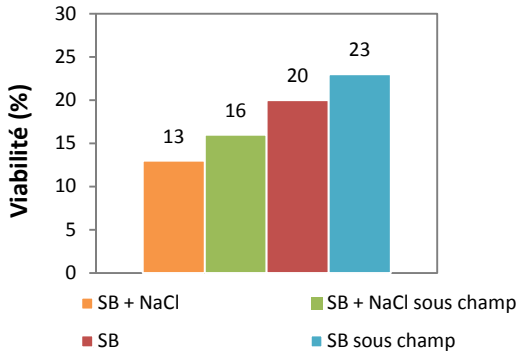


Figure 7 : Viabilité des cellules en suspension dans du milieu non dilué avec 20 µM de fer en présence de sels (en orange), en présence de sels et d'un champ (en vert), en absence de sels (en rouge) et en absence de sels sous champ (en bleu) après 7 jours (expérience réalisée une fois)

Les résultats ont été obtenus sur des suspensions contrôles avec et sans sels en présence ou absence d'un champ (Fig. 7). Etant donné que les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois, nous pouvons donc seulement voir que la présence de sels ne semble pas affecter les bactéries. En effet, il n'y a que 10 % d'écart entre la suspension contenant des sels (en orange) et celle sans sels sous champ (en bleu). Cette différence est de l'ordre des écarts types en général. La figure 7 n'indique donc pas de différence notable de viabilité entre toutes les conditions étudiées. On peut donc discuter valablement l'effet du champ magnétique sur la production de magnétosomes dans les observations macroscopiques des suspensions où le nombre de bactéries produisant des magnétosomes est plus important au bout de 7 jours que ce soit en présence ou en absence de sels. Cette observation directe de la production des magnétosomes affirme que les bactéries sont viables.

Les tests de viabilité ont également été menés sur des suspensions avec du milieu dilué avec 100 µM de fer au bout de 7 jours afin de voir l'influence du champ et des sels sur les bactéries.

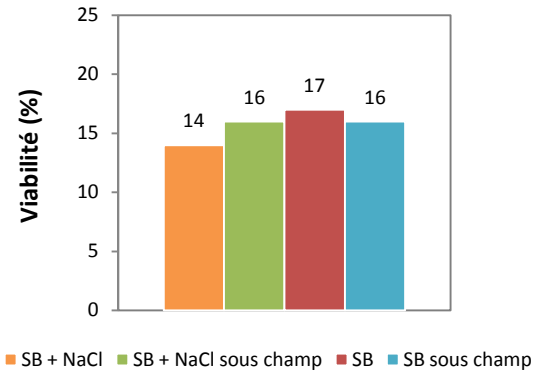


Figure 8 : Viabilité des cellules en suspension dans du milieu dilué avec 100 µM de fer en présence de sels (en orange), en présence de sels et d'un champ (en vert), en absence de sels (en rouge) et en absence de sels sous champ (en bleu) après 7 jours (expérience réalisée une fois)

Les résultats ont été obtenus sur des suspensions avec du milieu de culture dilué supplémenté avec 100 µM de fer en présence et absence de sels sous exposition ou non au champ magnétique (Fig. 8). Le pourcentage de bactéries viables est identique pour toutes les suspensions au bout de 7 jours. Le champ et la présence de sels ne semblent donc pas affecter la viabilité des bactéries.

Etant donné que les bactéries en suspension semblaient mieux produire des magnétosomes dans les milieux non dilués en présence ou en absence de sels (d'après les observations macroscopiques) et que celles-ci restaient viables, nous avons donc choisi de réaliser les études de viabilité dans les gels avec le milieu non dilué avec 20 et 100 µM de fer. Une concentration plus importante en fer (100 µM) ne semble pas affecter les bactéries et permettrait donc un apport

suffisant en fer tout au cours du temps. Afin de valider ces observations, une étude de la viabilité des cellules encapsulées et en suspension au bout de 7 jours a été réalisée.

4. Viabilité des bactéries dans les gels

Comme les cellules sont piégées dans les gels en présence de nutriments, celles-ci voudront peut-être se diviser dans un espace confiné, ce qui peut donc provoquer un stress mécanique (Nassif *et al.,* 2002). Les tests de viabilité avaient donc été conduits auparavant sur des cellules privées de nutriments (cf. chapitre 3) afin d'éviter un stress trop important. Cependant, la production des magnétosomes dans les gels nécessite d'encapsuler les cellules avec leur milieu de culture. Nous avons donc réalisé des tests de viabilité sur des bactéries encapsulées et en suspension afin de déterminer l'effet du confinement et le milieu de culture le plus propice pour préserver au mieux les cellules viables et permettre la production des magnétosomes.

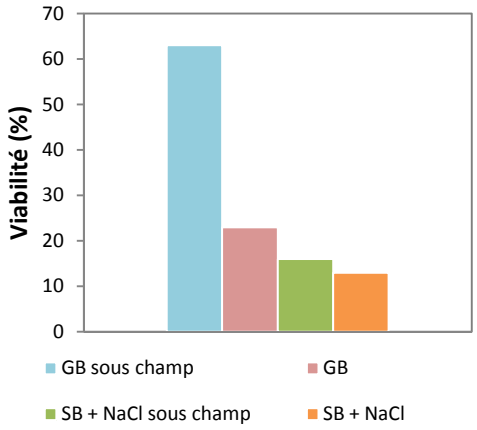


Figure 9 : Pourcentage de viabilité des bactéries encapsulées dans les gels en présence d'un champ (en bleu) et en absence d'un champ (en rose) et des bactéries en suspension en présence d'un champ (en vert) et en absence d'un champ (en orange) après 7 jours (expérience réalisée une fois)

La viabilité des bactéries encapsulées et en suspension dans du milieu non dilué avec 20 µM de fer a été évaluée au bout de 7 jours en présence ou en absence de champ magnétique (Fig. 9). Etant donné que les gels contiennent des sels, il était important de ne garder pour comparaison que les suspensions contrôles avec 0,15 M de chlorure de sodium (correspondant à la concentration en NaCl dans les gels). D'après les résultats obtenus, il semblerait que les bactéries survivent mieux dans les gels et surtout en présence d'un champ. Toutefois ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois, ce qui peut compliquer nos interprétations. Le champ pourrait améliorer la viabilité des bactéries mais là encore il est extrêmement difficile de confirmer cette hypothèse juste avec une seule mesure. Nous pouvons donc remarquer que le milieu de culture non dilué avec une concentration en fer de 20 µM permet de garder les cellules viables dans les gels.

Par la suite, les expériences ont été menées sur des bactéries encapsulées et en suspension dans du milieu de culture non dilué avec 100 µM de fer au bout de 7 jours d'exposition ou non à un champ magnétique (Fig. 10). Ces études nous permettront particulièrement de voir l'effet de l'augmentation de la concentration en fer sur la viabilité des cellules.

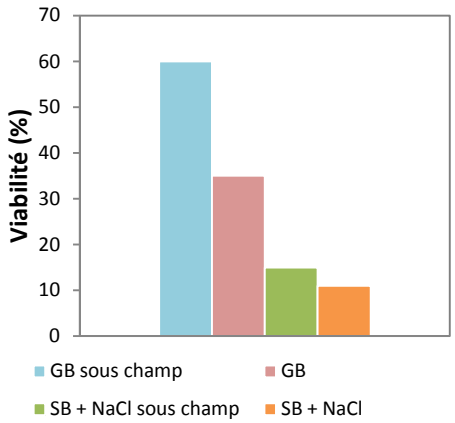


Figure 10 : Pourcentage de viabilité des bactéries encapsulées dans les gels en présence d'un champ (en bleu) et en absence d'un champ (en rose) et des bactéries en suspension en présence d'un champ (en vert) et en absence d'un champ (en orange) après 7 jours (expérience réalisée une fois)

Les résultats sont très similaires à ceux obtenus précédemment avec le milieu non dilué contenant 20 µM de fer. Une concentration plus élevée en fer à 100 µM n'affecte donc pas la viabilité des cellules et permettrait probablement d'améliorer la production des magnétosomes.

Suite à toutes ces observations, nous avons pu remarquer que quel que soit le milieu de culture et la concentration en fer, la viabilité des bactéries en suspension semblait similaire au bout de 7 jours. La viabilité des cellules encapsulées était préservée dans les gels contenant du milieu de culture non dilué avec 20 µM et 100 µM de fer. Pour l'étude des processus de biominéralisation, nous avons donc choisi de travailler seulement avec des bactéries encapsulées et en suspension dans du milieu de culture non dilué avec 100 µM de fer. Ainsi, une concentration plus élevée en fer permettrait un apport suffisant pour les bactéries. Afin de voir l'effet de l'encapsulation sur les phénomènes de biominéralisation, nous avons étudié en parallèle, les suspensions de bactéries contrôles.

II. Etude sur les processus de biominéralisation

A. Viabilité des bactéries dans les gels et les suspensions contrôles pour l'étude des processus de biominéralisation

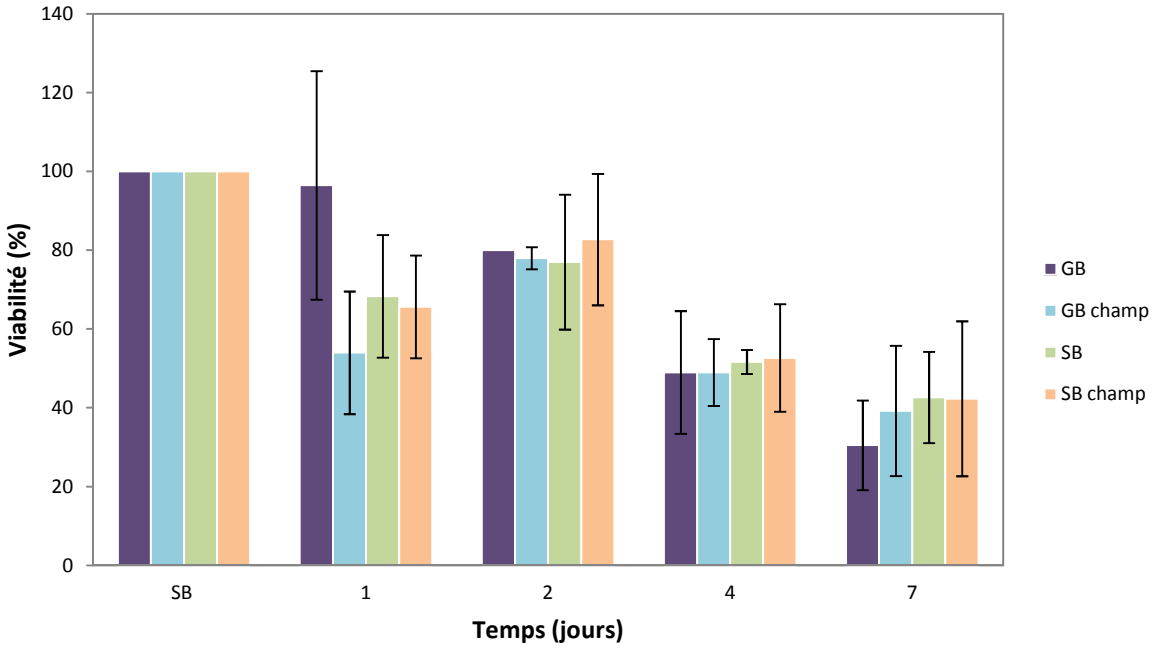


Figure 11: Viabilité des cellules encapsulées en présence (en bleu) et en absence d'un champ (en violet) et des cellules en suspension en présence (en orange) et en absence d'un champ (en vert), après 1, 2, 4 et 7 jours

La viabilité des cellules a été évaluée au cours du temps au bout de 1, 2, 4 et 7 jours pour les gels et les suspensions contrôles en présence et en absence de champ dans un milieu non dilué avec 100 µM de fer (Fig. 11). Les pourcentages de viabilité au cours du temps ont été déduits de la référence à 100 % correspondant à la suspension bactérienne initiale avant l'encapsulation. Comme nous avons pu voir précédemment que la viabilité des cellules était préservée dans les gels avec un milieu non dilué contenant 100 µM de fer au bout de 7 jours, nous avons choisi de conserver cette composition pour effectuer les tests de biominéralisation sur les bactéries. Le suivi a été réalisé sur plusieurs jours afin de pouvoir corréler les pourcentages de viabilité aux observations microscopiques. Le nombre de bactéries viables a été déterminé grâce au test Alamar Blue.

Nous pouvons remarquer qu'au bout de 1 et 2 jours, les proportions de bactéries viables dans les gels en absence d'un champ (en violet) et en présence d'un champ (en bleu), passent de 97 % (+/- 29 %) à 80 % (+/- 1 %) et de 54 % (+/- 16 %) à 78 % (+/- 3 %). En ce qui concerne les suspensions, nous pouvons observer que le nombre de bactéries viables en absence d'un champ (en vert) passe de 68 % (+/- 16 %) à 77 % (+/- 17 %) tandis qu'en présence d'un champ (en orange), les

pourcentages passent de 66 % (+/- 13 %) à 83 % (+/-17 %). En prenant compte des écart-types, nous pouvons constater que seules les bactéries issues du gel sous champ pourraient se diviser légèrement au bout de 2 jours. Toutefois, nous remarquons que même si les cellules se divisent, leur nombre ne varie pas de manière exponentielle comme dans des cultures standard. En effet, le nombre de bactéries encapsulées est très important. Elles vont donc très rapidement consommer les nutriments qui se retrouvent très vite en concentration limitante. Les bactéries se retrouvent donc très vite en phase stationnaire. Entre 2 et 4 jours, le nombre de bactéries viables diminuent pour toutes les conditions et passe de 80 % à 50 % en moyenne. Au bout de 7 jours, le pourcentage de cellules viables n'évolue pas de manière significative (d'après les écarts-types) par rapport aux bactéries à 4 jours. Tous ces résultats nous montrent que la viabilité des cellules n'est pas influencée par la présence d'un champ magnétique ni par l'encapsulation lorsque les bactéries sont en présence de nutriments. Entre 2 et 7 jours, les observations microscopiques pourront donc être entièrement corrélées entre les suspensions et les gels car le nombre de bactéries viables en moyenne est très similaire.

Afin de mieux percevoir l'effet du milieu de culture sur la viabilité des cellules, les bactéries ont été mises en suspension et encapsulées avec du tampon phosphate 10 % glycérol au lieu du milieu de culture. Nous avons ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus pour les bactéries en suspension et encapsulées avec le milieu de culture au bout de 7 jours (Fig. 12).

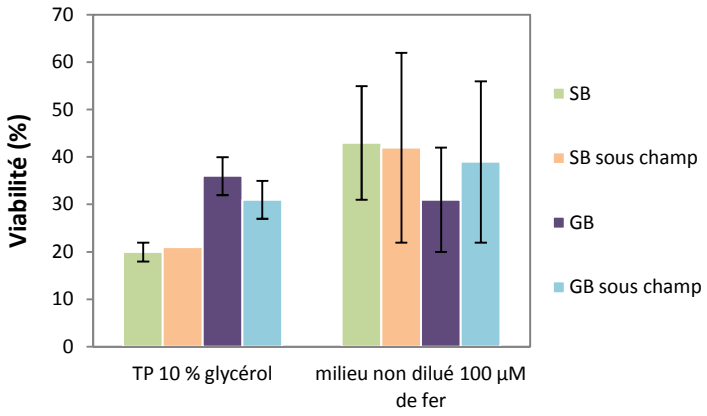


Figure 12 : Viabilité des bactéries en suspension en présence d'un champ (en orange) et en absence d'un champ (en vert) et viabilité des bactéries encapsulées en présence d'un champ (en bleu) et en absence d'un champ (en violet) après 7 jours

La figure 12, nous montre la viabilité des bactéries en suspension en présence d'un champ (en orange) et en absence d'un champ (en vert) et dans les gels en présence d'un champ (en bleu) et en absence d'un champ (en violet) au bout de 7 jours. Les références à 100 % correspondent à la

suspension bactérienne initiale avant l'encapsulation et la préparation des suspensions contrôles. Les gels et les suspensions contrôles ont été conçus avec deux milieux :

- tampon phosphate avec 10 % de glycérol
- milieu de culture non dilué avec 100 µM de fer

Nous remarquons sur le graphique (Figure 12) que le nombre de cellules viables est plus important dans les gels avec du tampon phosphate supplémenté en glycérol par rapport aux suspensions. Les bactéries encapsulées avec du milieu de culture sont elles tout autant viables que celles en présence du tampon phosphate 10 % glycérol. Lorsque les bactéries sont en suspension dans le milieu de culture, le nombre de cellules viables double par rapport à celles qui ne sont pas en présence de nutriments. Ces résultats nous montrent donc que la viabilité relative des cellules est meilleure dans les gels par rapport aux bactéries en suspension lorsque celles-ci sont privées de nourriture. Ces observations confortent les résultats obtenus chez les *Escherichia coli* (Nassif *et al.,* 2002) et nous montrent également que d'autres types de cellules peuvent se comporter de la même manière que les *Escherichia coli* dans les gels.

Après avoir montré que la viabilité des cellules était préservée dans les gels et les suspensions contenant du milieu de culture, nous avons pu étudier les processus de biominéralisation sur un temps de 7 jours.

B. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées sans magnétosomes

Les études des phénomènes de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques sont très complexes dans nos conditions expérimentales et ce pour plusieurs raisons :

- Une éventuelle division cellulaire pourrait conduire à sous-estimer les proportions de bactéries produisant des magnétosomes
- la perte de viabilité au cours du temps pourrait affecter différemment soit des bactéries sans magnétosomes soit des bactéries ayant produit des magnétosomes et dans ce cas, les évaluations par microscopie du nombre de bactéries ayant produit des magnétosomes seraient entachées d'une imprécision supplémentaire

1. Observation des bactéries par microscopie électronique en transmission pour l'étude des phénomènes de biominéralisation

a) *Suspension initiale*

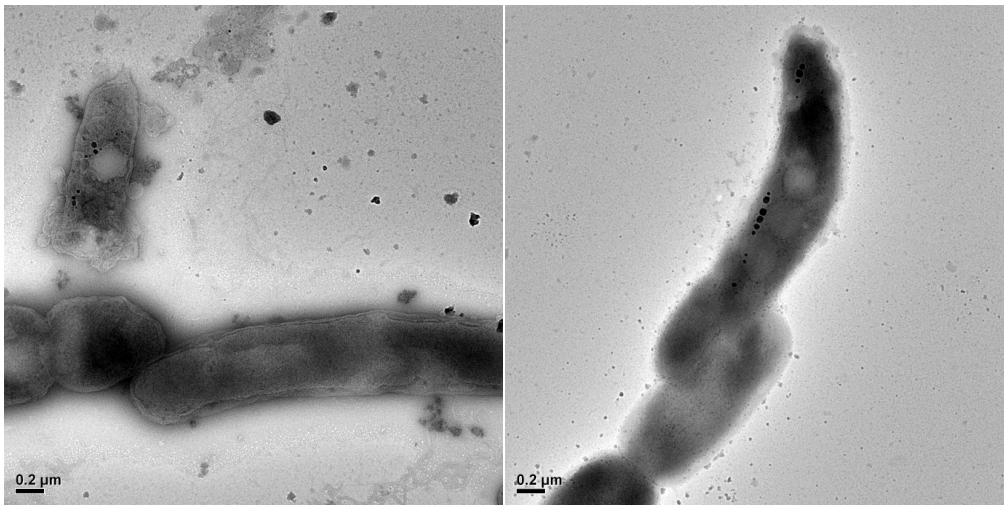


Figure 13 : Bactéries issues de la suspension initiale avant l'encapsulation. Bactéries préalablement cultivées en absence de quinate de fer pendant 2 jours

L'observation des bactéries dans la suspension initiale préalablement cultivées en absence de fer pendant 2 jours (au lieu de 7 jours), nous a permis de déterminer la forme des magnétosomes, leur alignement en chaîne et le nombre de bactéries contenant des magnétosomes. Sur 100 bactéries observées, 20 cellules possédaient encore des magnétosomes avant l'encapsulation (Fig. 13). En effet, les cultures contiennent de très faibles quantités de sulfate de fer (0,7 µM de fer) essentielles pour le bon fonctionnement de l'activité enzymatique, ce qui pourrait peut-être expliquer la présence de magnétosomes pour certaines bactéries. De plus lors de la division cellulaire, les chaînes de magnétosomes se coupent en deux et se répartissent dans les deux cellules après division (Staniland *et al.,* 2010), ce qui pourrait également expliquer la présence de magnétosomes chez certaines bactéries. D'après nos observations, les magnétosomes se présentaient soit en chaînes linéaires soit en chaînes disloquées. Les magnétosomes parfois répartis librement dans la cellule, étaient de taille très diverse (nanoparticules superparamagnétiques et monodomaines stables).

b) *Bactéries encapsulées sans magnétosomes*

Les bactéries extraites des gels ont été également observées au MET après 1, 2, 4 et 7 jours d'encapsulation en présence et en absence d'un champ magnétique. Sur 100 bactéries visualisées pour chaque échantillon, nous avons déterminé la fraction des cellules magnétiques (contenant des magnétosomes) et des cellules non magnétiques (sans magnétosomes). Nous avons décidé de ne présenter que les bactéries avec des magnétosomes dans un souci de comparaison pour chaque temps d'encapsulation en présence ou en absence d'un champ magnétique.

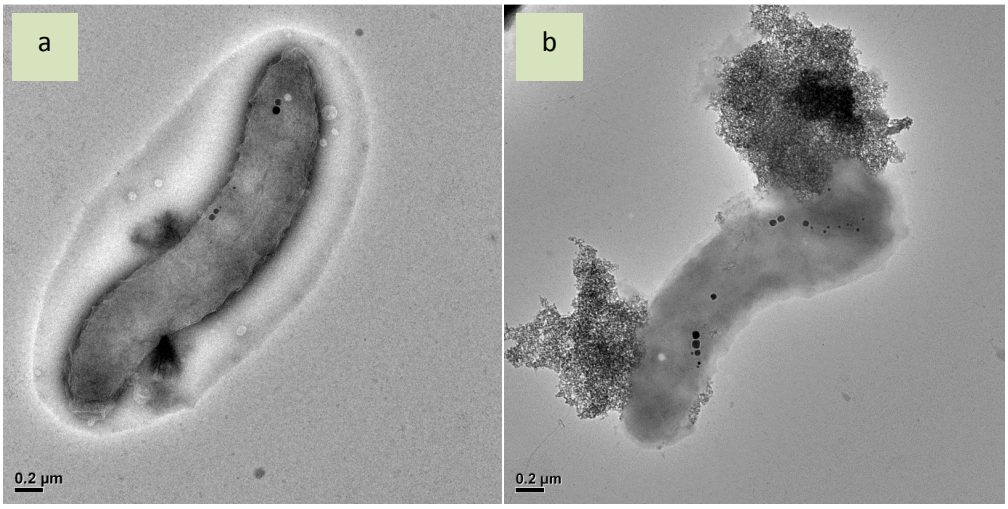


Figure 14 : Bactéries extraites des gels après 1 jour d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

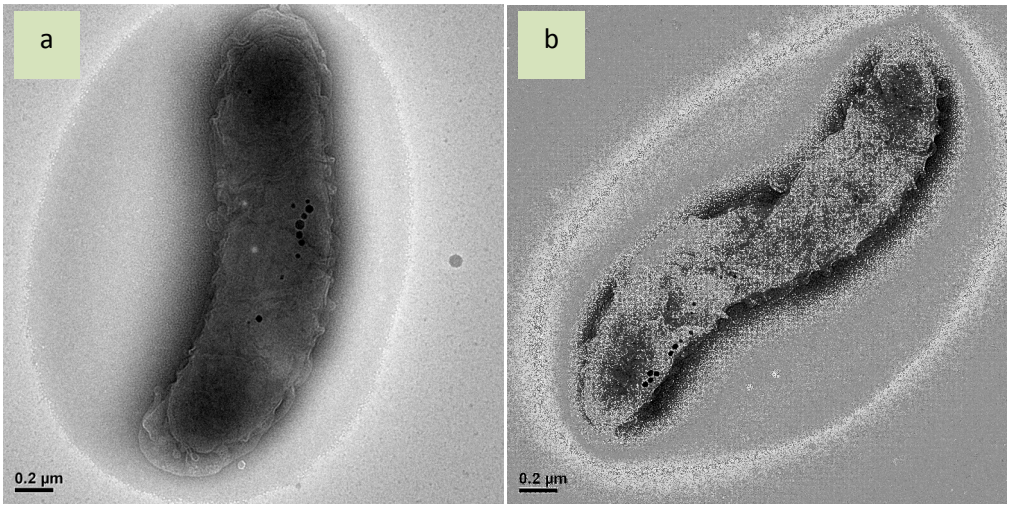


Figure 15 : Bactéries extraites des gels après 2 jours d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

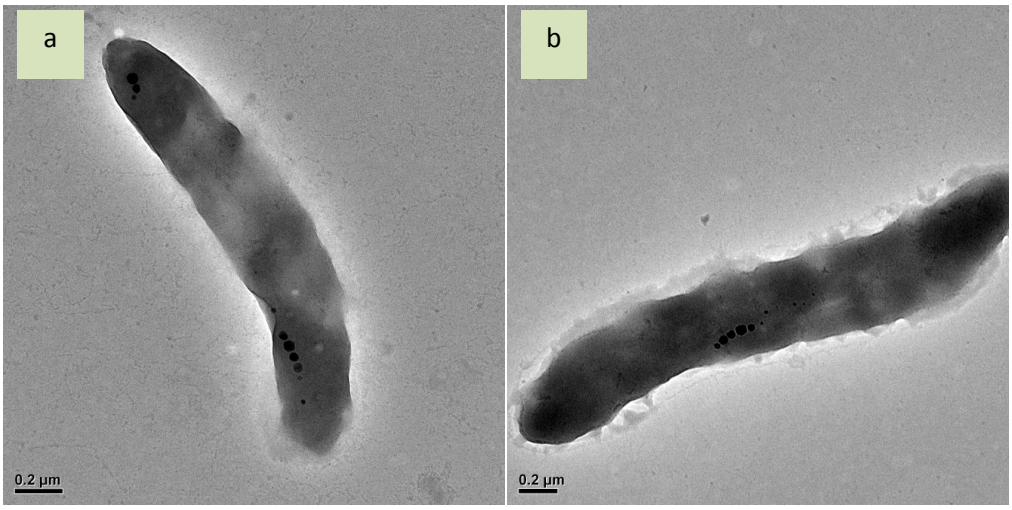


Figure 16 : Bactéries extraites des gels après 4 jours d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

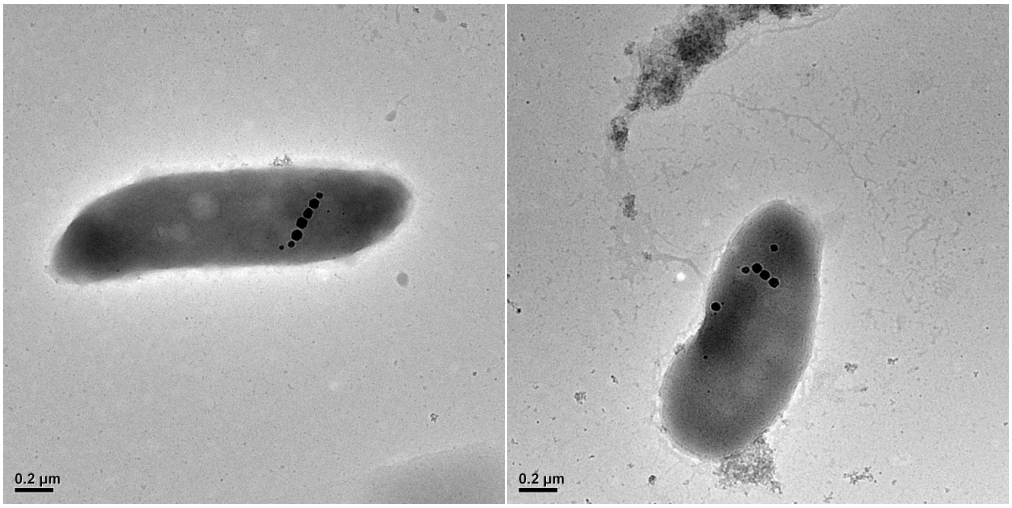


Figure 17 : Bactéries extraites des gels après 4 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Au bout de 4 jours d'encapsulation en présence d'un champ magnétique, nous pouvons constater que les bactéries présentent des chaînes courtes de 3 à 6 magnétosomes orientés transversalement à la bactérie (Fig. 17).

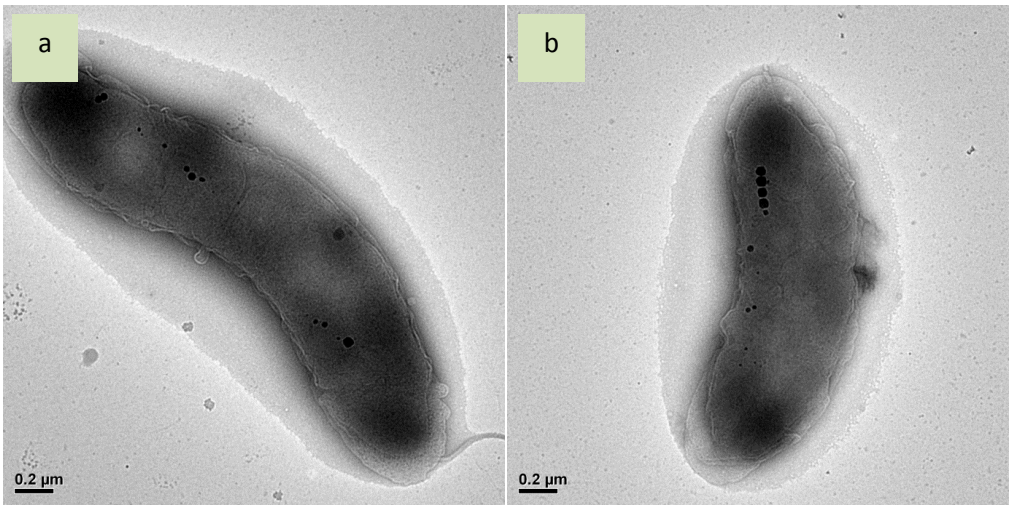


Figure 18 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

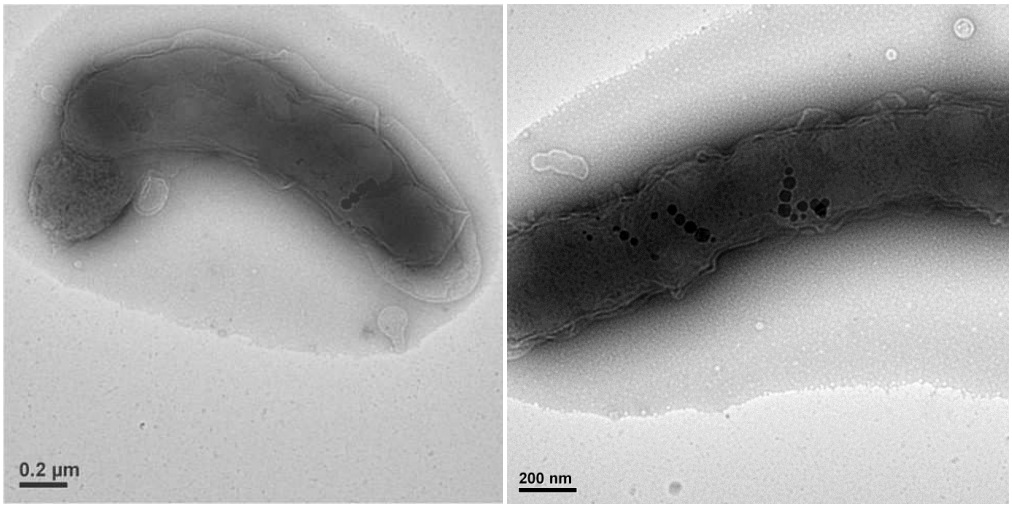


Figure 19 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Au bout de 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ magnétique, certaines bactéries contiennent également des chaînes de magnétosomes inclinées par rapport à l'axe longitudinal de la bactérie (Fig. 19). Les bactéries observées possèdent le plus souvent une chaîne de 4 magnétosomes ou bien plusieurs chaînes de 3 à 4 magnétosomes.

Toutes ces observations ont montré que les bactéries possédaient des petits magnétosomes immatures inférieur à 35 nm (superparamagnétiques) qui souvent étaient disposés de manière aléatoire au sein de la cellule. Il semblerait que ces petites particules soient en train de se former en parallèle à différents endroits au niveau de la cellule. Selon l'article de Komeili *et al.,* 2004, les vésicules des magnétosomes sont présentes avant la formation de la magnétite, ce qui montre qu'il est possible pour la cellule de produire plusieurs magnétosomes en même temps plutôt que un par un. Par rapport à la suspension initiale, aucune différence visible n'a été observée sur la forme des nanoparticules biogéniques pour les bactéries encapsulées en présence et en absence d'un champ

magnétique. Tout comme dans la suspension initiale, les chaînes sont parfois disloquées formant ainsi deux chaînes au lieu d'une.

c) *Bactéries dans les suspensions contrôles*

Afin de comprendre l'effet de l'encapsulation sur la formation des magnétosomes, une étude a été menée en parallèle sur des bactéries en suspension (contrôle).

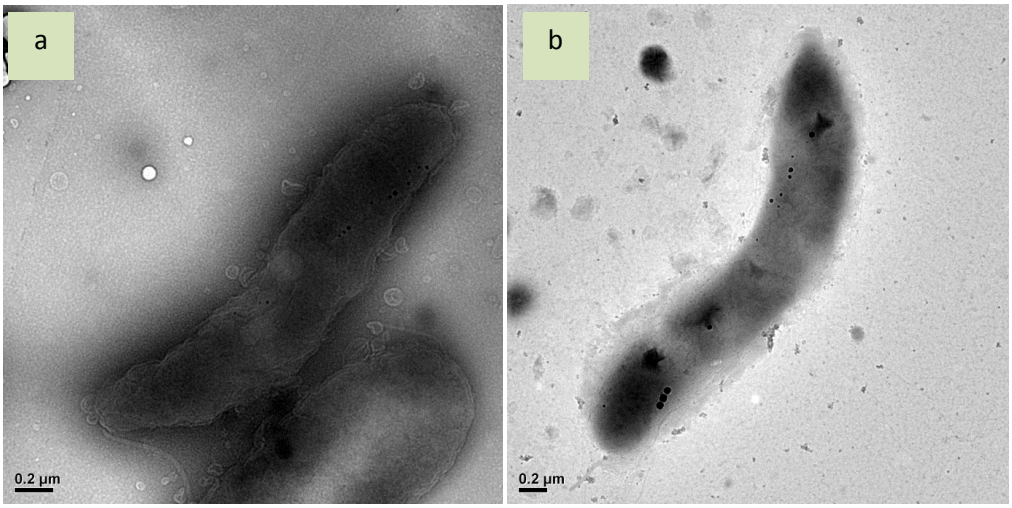


Figure 20 : Bactéries en suspension après 1 jour en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

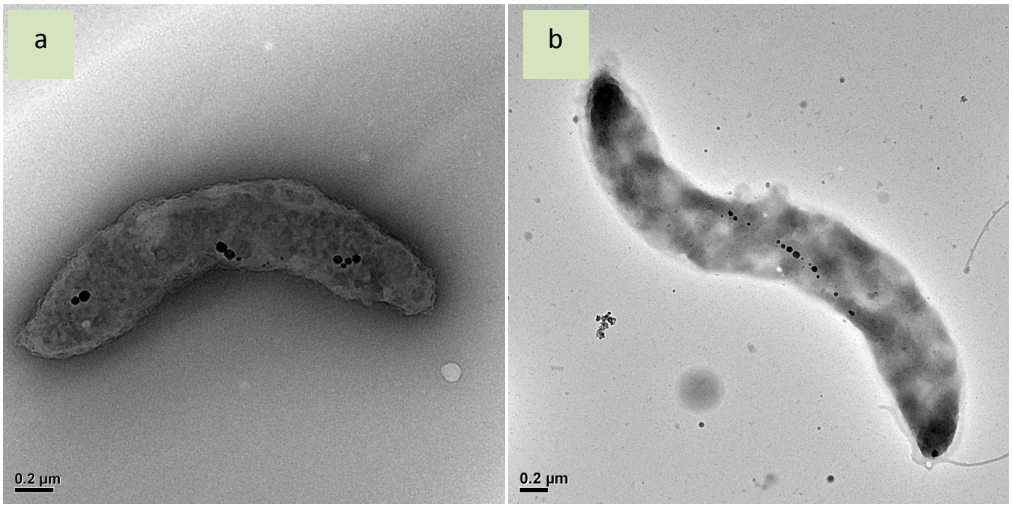


Figure 21 : Bactéries en suspension après 2 jours en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

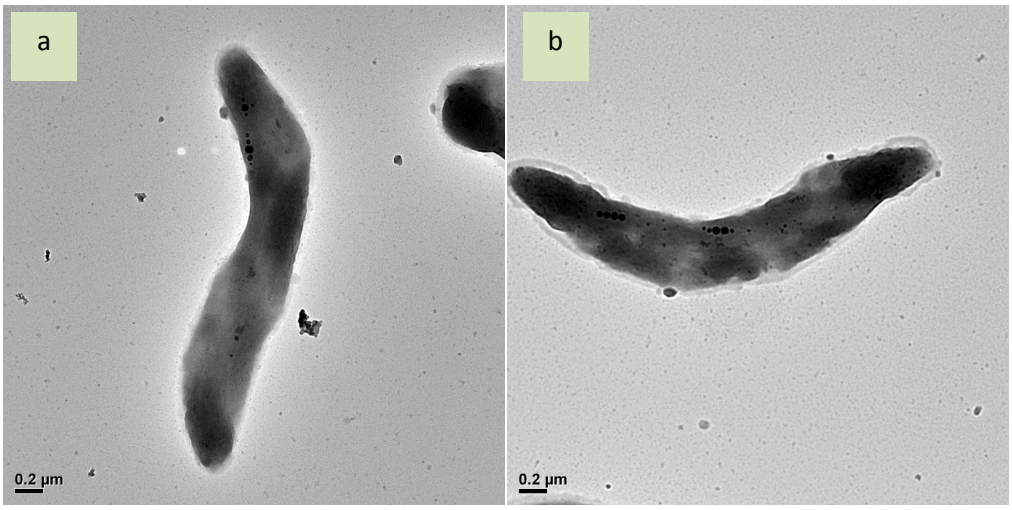


Figure 22 : Bactéries en suspension après 4 jours en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

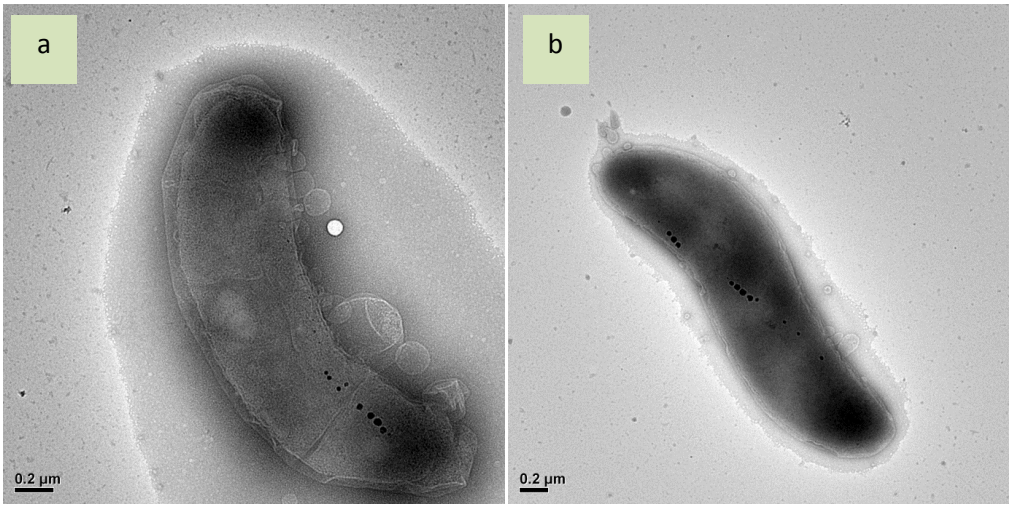
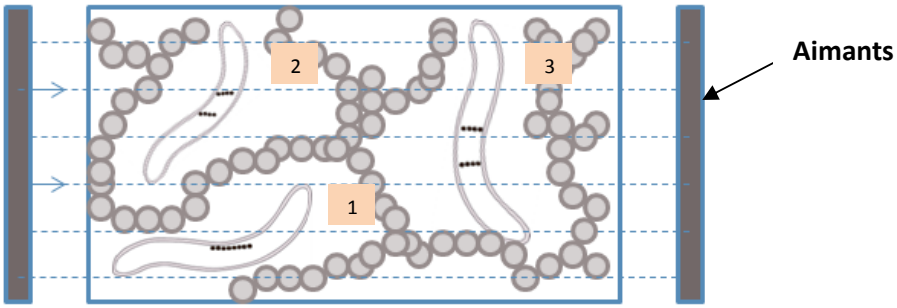


Figure 23 : Bactéries en suspension après 7 jours en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

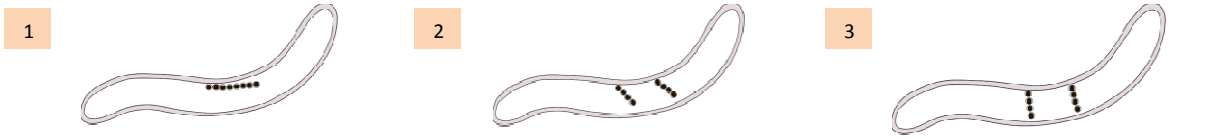
Les bactéries en suspension présentent les mêmes caractéristiques que celles dans la suspension initiale et dans les gels en absence d'un champ magnétique. Contrairement aux cellules encapsulées en présence d'un champ, elles ne présentent pas de chaînes de magnétosomes inclinées ou perpendiculaires à l'axe longitudinal de la bactérie. Ces observations suggèrent que le champ magnétique a un impact sur les cellules piégées dans les matrices de silice en modulant l'orientation des chaînes.

Une hypothèse pourrait expliquer ce phénomène. Lors de la gélification, les bactéries dispersées dans le gel, sont piégées dans une position aléatoire par rapport au champ. Comme elles ne peuvent plus bouger, les magnétosomes en formation ou bien déjà présents dans la cellule vont s'orienter dans le sens des lignes de champ magnétique. Ainsi une bactérie orientée perpendiculairement aux lignes de champ (situation 3), pourrait présenter des chaînes de magnétosomes orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal de la bactérie et parallèlement

aux lignes de champ (orientation à 90°) (Fig. 24). Une bactérie encapsulée de manière inclinée pourrait présenter des chaînes légèrement inclinées par rapport à l'axe longitudinal de la cellule (situation 2) (inclinaison à 45°). Dans le cas où les bactéries sont encapsulées dans le sens du champ, celles-ci présenteront des chaînes le long de l'axe longitudinal et donc parallèles au champ (situation 1).



sens des lignes de champ ⟶



Chaîne longitudinale

Chaîne déviée à 45° de l'axe longitudinal

Chaîne déviée à 90° de l'axe longitudinal (perpendiculaire)

Figure 24 : Schéma explicatif du positionnement des magnétosomes dans le champ magnétique

D'une manière générale, les bactéries présentent des nanoparticules matures (monodomaines stables) et immatures (superparamagnétiques). Les petites particules de taille inférieure à 35 nm sont souvent dispersées au sein des cellules et non alignées en chaîne. Ces observations suggèrent que la formation des magnétosomes se déroule à des endroits multiples au sein de la cellule (Li *et al.,* 2009[a] ; Faivre *et al.,* 2007 ; Komeili *et al.,* 2004 ; 2006). Pour les bactéries encapsulées ou en suspension (contrôle), les particules biogéniques sont arrangées en une chaîne unique ou multiple de la même manière que pour les bactéries dans la suspension initiale. Aucune différence n'a été observée sur la forme des magnétosomes que ce soit en présence ou en absence d'un champ magnétique. Il est donc particulièrement difficile de dissocier la faible fraction de bactéries introduites initialement avec des magnétosomes de celles qui ont produit des particules après l'encapsulation ou la remise en suspension (contrôle).

Les magnétosomes immatures se retrouvent souvent en bout de chaîne et ne sont pas forcément alignés comme les grosses particules. D'après ces observations, il est possible que

l'arrangement des magnétosomes se déroule à un moment où les magnétosomes arrivent à une taille critique. Cette hypothèse n'a à notre connaissance, pas encore été démontrée mais il se pourrait que lorsque les magnétosomes atteignent une certaine taille, le filament MamK (de type cytosquelette) collecte les magnétosomes pour les arranger en chaînes. Des études ont d'ailleurs suggéré que chez les *M. gryphiswaldense,* les vésicules des magnétosomes se détachent de la membrane cytoplasmique et formerait ainsi un compartiment distinct après la différentiation (Grünberg *et al.,* 2004 ; Scheffel *et al.,* 2006). Un procédé a donc été envisagé suite à ces observations. La nucléation des cristaux de magnétite se produirait principalement au niveau de la membrane cytoplasmique puis la croissance ultérieure se déroulerait après que les vésicules matures chargées en fer soient séparées de la membrane cytoplasmique (Faivre *et al.,* 2007). La minéralisation de la magnétite pourrait d'abord se produire directement dans les invaginations (les cristallites en formation seraient associés à la membrane) puis la dernière étape de croissance des cristaux pourrait se dérouler lorsque les vésicules sont séparées de la membrane cytoplasmique (Faivre *et al.,* 2007).

En présence d'un champ magnétique statique, nous avons pu parfois observer des bactéries avec de courtes chaînes de 3 à 6 magnétosomes orientés de manière perpendiculaire à l'axe longitudinal lorsque les cellules sont encapsulées dans une matrice de silice. D'après Komeili *et al.,* 2006, de courts filaments MamK rassembleraient 4 à 5 magnétosomes. Cette étude conforte donc nos observations. Le filament MamK permettrait de stabiliser les magnétosomes en chaîne afin d'éviter leur agrégation et leur déplacement dans la cellule.

2. Effet du champ magnétique sur le nombre de cellules contenant des magnétosomes

Dans l'étude précédente, nous avons pu démontrer que le champ magnétique affectait l'orientation des magnétosomes pour des bactéries encapsulées dans les matrices de silice.

Afin d'étudier l'effet du champ sur le nombre de bactéries produisant des magnétosomes, la proportion de cellules magnétiques (avec magnétosomes) dans les gels et les suspensions a pu être déterminée par microscopie électronique en transmission. Il s'agit d'une technique adaptée pour quantifier les cellules magnétiques et non magnétiques ainsi que le nombre de magnétosomes produits, moyennant une statistique suffisante en termes de nombres de cellules observées. Pour la quantification des cellules magnétiques et non magnétiques, 100 bactéries ont été observées pour tous les échantillons. Le nombre de magnétosomes par cellules a été déterminé dans la majorité des cas, sur la fraction de cellules magnétiques observées au préalable. Les bactéries conservées à -20°C

dans 20 % de glycérol ont été lavées dans du tampon phosphate et concentrées par centrifugation avant les observations au MET (cf. Annexe 4).

La proportion de bactéries ayant produit des magnétosomes sur 100 cellules observées au MET est représentée dans le graphique ci-dessous afin d'établir une statistique (Fig. 25). Le nombre de cellules magnétiques (contenant des magnétosomes) est estimé en pourcentage pour les bactéries encapsulées dans les gels en présence d'un champ (en bleu) et en absence d'un champ (en violet) et pour des bactéries en suspension en présence d'un champ (en orange) et en absence d'un champ (en vert).

Le nombre de bactéries avec des magnétosomes est déterminé au bout de 1, 2, 4 et 7 jours pour des échantillons issus de la même expérience. La proportion de cellules magnétiques dans la suspension bactérienne initiale avant l'encapsulation et la préparation des suspensions contrôles s'élève à 20 % environ (représentée par la ligne pointillée sur le graphique).

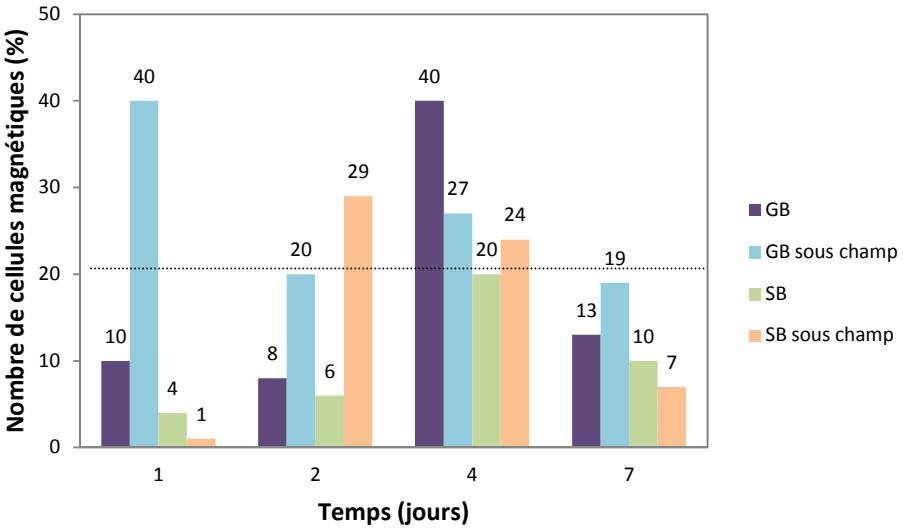


Figure 25 : Proportion de cellules contenant des magnétosomes (représentée en pourcentage) pour des bactéries encapsulées et en suspension en présence et en absence d'un champ magnétique après 1, 2, 4 et 7 jours (100 bactéries ont été observées pour chaque échantillon)

Etant donné que les comptages sont très longs à effectuer au microscope électronique, nous avons seulement présenté les résultats d'une seule expérience. D'une manière générale, nous pouvons remarquer que les bactéries encapsulées dans les gels produisent plus de magnétosomes que celles en suspension. Au bout d' 1 jour, 40 % des bactéries contiennent des magnétosomes pour les gels exposés au champ tandis que le nombre de cellules magnétiques en absence d'un champ s'élève à 10 %. Au bout de 2 jours, la fraction de bactéries avec des magnétosomes reste stable pour le gel non exposé au champ tandis que le nombre de bactéries magnétiques exposées au champ

diminue de moitié. Au bout de 4 jours, on observe une augmentation du nombre de bactéries avec des magnétosomes (40 %) en absence d'un champ et une légère augmentation de cellules magnétiques dans le gel exposé au champ (27 %). Pour les deux gels, la viabilité des cellules diminue à 50 % environ que ce soit en présence ou en absence d'un champ (cf. Fig. 11). Comme les bactéries ne peuvent pas se diviser et qu'elles diminuent en nombre (mort cellulaire), l'augmentation de la fraction de cellules magnétiques reflète donc bien une production des magnétosomes au bout de 4 jours d'encapsulation. Cette production plus marquée pour les bactéries encapsulées dans les gels non exposés au champ magnétique serait donc significative au bout de 4 jours (40 % de cellules magnétiques) tandis que pour le gel sous champ cette production débute au bout de 24h (40 % de cellules magnétiques). Au bout de 7 jours, la fraction de bactéries magnétiques diminue à 13 % pour le gel non exposé au champ et à 19 % pour le gel sous champ. Il est possible qu'au bout de 7 jours, les bactéries magnétiques soient plus affectées et meurent, ce qui aurait pour effet de diminuer la proportion de bactéries magnétiques dans les gels. En effet, selon les tests de viabilité effectués au cours de cette expérience, le nombre de bactéries diminuait de 30 % entre 4 et 7 jours en présence et en absence d'un champ. Etant donné que le taux de bactéries magnétiques est très fortement influencé par la division et la mort cellulaire qui peuvent affecter aussi bien des cellules magnétiques que des cellules non magnétiques, il est donc très difficile d'interpréter précisément les résultats. Mis à part les phénomènes de division ou de mort cellulaire, nous pouvons remarquer que la proportion de bactéries magnétiques est plus importante dans le gel exposé au champ au bout de 1 jour alors que cette fraction est plus élevée pour le gel non exposé au champ au bout de 4 jours. La présence d'un champ magnétique stimule donc la production des magnétosomes qui va alors se dérouler de manière anticipée au bout de 1 jour au lieu de 4 jours. De plus, pour des bactéries en culture classique, la production des magnétosomes se déroule généralement au bout de 4 jours (d'après l'observation de nos cultures) ce qui conforte donc nos résultats.

En ce qui concerne les bactéries en suspension, celles-ci ne produisent pas de magnétosomes au bout d'1 jour. La proportion de cellules magnétiques est de 4 % en absence d'un champ et de 1 % en présence d'un champ. Cette diminution du nombre de bactéries contenant des magnétosomes après un jour, nous montre que la faible fraction de cellules magnétiques initialement introduite dans la suspension, est affectée. Ces observations suggèrent qu'une augmentation du nombre de cellules magnétiques après 2 jours, signifierait que les bactéries produisent des magnétosomes. Au bout de 2 jours, il semblerait que le champ magnétique stimule la production des magnétosomes (29 % des bactéries contiennent des nanoparticules) tandis qu'en absence d'un champ, le nombre de cellules magnétiques reste à peu près constant (6 %). C'est seulement au bout de 4 jours que les bactéries produisent des magnétosomes (20 %) alors que sous exposition au champ, le pourcentage

diminue légèrement à 24 %. Après 7 jours, le nombre de cellules magnétiques diminue à 10 % et 7 % pour les bactéries non exposées et exposées au champ.

Pour résumer, nous pouvons constater que le champ magnétique stimule la production des magnétosomes de manière anticipée au bout de 1 jour pour les bactéries encapsulées et 2 jours pour les cellules en suspension. En absence de champ magnétique, la production des magnétosomes se produit au bout de 4 jours pour les bactéries encapsulées et en suspension. Nous observons que les pourcentages de bactéries contenant des magnétosomes sont généralement plus importants lorsqu'elles sont encapsulées. Le gel et le champ magnétique favorisent donc la production des nanoparticules biogéniques.

3. Effet du champ magnétique sur le nombre de magnétosomes par cellule

Le nombre de magnétosomes par cellule a ensuite été déterminé pour les bactéries encapsulées et en suspension en présence et en absence d'un champ magnétique afin de savoir si le champ magnétique augmente la production des magnétosomes comme il a été démontré dans l'étude de Wang *et al.,* 2009[b]. Les résultats sont regroupés dans les tableaux 7 et 8. Les particules sont comptées sur une gamme de tailles (superparamagnétiques < 35 nm jusqu' à 50 nm environ). Le nombre de magnétosomes a été estimé sur la fraction de cellules magnétiques déterminée auparavant. Nous n'avons donc pas pu faire de statistiques sur 100 bactéries avec des magnétosomes car celles-ci sont trop peu nombreuses dans les différents échantillons.

D'après le tableau 7, nous pouvons voir que les bactéries encapsulées dans les gels et exposées au champ magnétique ne produisent pas plus de magnétosomes que sans champ. Les bactéries possèdent 10 magnétosomes en moyenne. Ces résultats nous montrent qu'un champ magnétique statique n'augmente pas le chargement en magnétosomes au sein des bactéries.

Tableau 7 : Nombre de magnétosomes par cellule encapsulée dans les gels en présence et en absence d'un champ

	Nombre de NPs/cellule pour les gels	
Temps (jours)	Absence de champ	Sous champ
1	9 +/- 4 (n = 10)	10 +/- 4 (n=28)
2	10 +/- 6 (n = 9)	11 +/- 4 (n = 13)
4	9 +/- 4 (n= 29)	11+/- 5 (n = 37)
7	9 +/- 4 (n = 18)	11 +/- 4 (n=17)

Pour les suspensions, il était plus difficile d'estimer l'augmentation du nombre de particules magnétiques dans les cellules. En effet, étant donné qu'au bout de 1 et 2 jours, il y a beaucoup moins de cellules avec des magnétosomes dans les suspensions par rapport aux cellules magnétiques dans les gels, le nombre moyen de magnétosomes a été déterminé sur moins de 5 bactéries (Tableau 8). Nous avons donc pu seulement comparer le nombre de magnétosomes produits en présence et en absence d'un champ au bout de 4 et 7 jours. Au bout de 4 et 7 jours, les bactéries contiennent autant de magnétosomes dans les deux conditions. Il n'y a donc pas d'augmentation visible de la production des particules magnétiques. Ces résultats nous montrent clairement que le champ n'affecte pas le nombre de magnétosomes par cellule dans les suspensions.

Tableau 8 : Nombre de magnétosomes par cellule en suspension en présence et en absence d'un champ

	Nombre de NPs/cellule pour les suspensions	
Temps (jours)	Absence de champ	Sous champ
1	9 +/-4 (n = 5)	14 +/- 2 (n = 2)
2	8 +/- 4 (n = 5)	12 +/- 4 (n = 44)
4	10 +/- 4 (n = 26)	10 +/- 4 (n = 33)
7	12 +/-4 (n = 52)	11 +/-4 (n = 51)

4. Suivi de la production des magnétosomes par des mesures du coefficient de magnétisme (Cmag)

Le coefficient de magnétisme (Cmag) peut être mesuré par diffusion de lumière (Schüler *et al.,* 1995). La valeur de Cmag peut être directement corrélée de manière linéaire au nombre de particules biogéniques. Elle peut donc nous renseigner sur la dynamique de production des magnétosomes mais également sur le pourcentage de bactéries contenant des magnétosomes (nombre de cellules magnétiques) (Zaho *et al.,* 2007). Les nombres moyens de magnétosomes et de cellules magnétiques sont donc étroitement liés à la valeur de Cmag.

Pour les mesures de Cmag, les bactéries sont placées dans une cuve de spectrophotomètre puis exposées à un champ magnétique créé par deux aimants permanents placés de part et d'autre de la cuve (cf. Annexe 13). Les aimants peuvent être placés de deux manières différentes : soit parallèles à la lumière monochromatique (infrarouge) traversant l'échantillon soit perpendiculaires. La lumière transmise est alors récupérée sur une photodiode et l'intensité lumineuse est ensuite convertie de manière proportionnelle en tension (E). La valeur de Cmag correspond à Emax / Emin. Le maximum de diffusion se produit lorsque le champ appliqué est parallèle à la lumière (Emax).

Le moment magnétique moyen des cellules dépend de la distribution et du nombre de particules individuelles (Schüler *et al.,* 1995). L'alignement des cellules magnétiques dans le champ appliqué lors de la mesure de Cmag, est fonction du nombre de magnétosomes.

Tableau 9 : Mesures du coefficient de magnétisme des cellules en suspension

	Cmag	
Jours	sans champ	avec champ
1	0	0,05 (+/- 0,05)
2	0,1 (+/- 0,1)	0,7 (+/- 0,7)
4	1,6 (+/- 0,1)	1,7 (+/- 0,06)
7	1,3 (+/- 0,1)	1,3 (+/- 0)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 9, nous pouvons constater que pour les bactéries exposées et non exposées au champ, les valeurs de Cmag sont croissantes au cours du temps. Le coefficient de magnétisme de chaque échantillon peut être comparé aux observations effectuées au MET. Nous remarquons que les bactéries en présence d'un champ commencent à produire des magnétosomes au bout de 2 jours. En effet, les valeurs du Cmag passent de 0,05 à 0,7 entre 1 et 2 jours. Comme nous pouvons le remarquer, les écarts-types sont très importants. En effet, au bout de 2 jours en absence d'un champ, les valeurs de Cmag étaient de 0 ; 0,4 et 0 tandis qu'en présence d'un champ, elles s'élevaient à 1,5 ; 0 et 0,5. Malgré les écarts-types importants, nous pouvons constater qu'en présence d'un champ, la production des magnétosomes semble favorisée. Comme les résultats le montrent, ce système est particulièrement très sensible. Toutefois, malgré les artéfacts liés aux problèmes de mesures, les observations macroscopiques et microscopiques suggéraient une augmentation du nombre de cellules magnétiques au bout de 2 jours d'exposition au champ magnétique (cf. Tableau 5 et Figure 25). Il semblerait donc que le nombre de bactéries avec magnétosomes soit plus important sous l'effet du champ au bout de 2 jours et donc que le champ stimulerait la production des particules biogéniques. Ces résultats sont cohérents avec les observations de microscopie électronique où 29 % des cellules contenaient des magnétosomes en présence d'un champ contre 6 % pour les bactéries non exposées (cf. Figure 25). Puis au bout de 4 jours, les valeurs de Cmag augmentent et passent à 1,7 en présence d'un champ et 1,6 en absence d'un champ. En microscopie, le nombre de cellules magnétiques était de 24 % sous exposition et de 20 % sans exposition. Ces proportions coïncident donc bien avec le coefficient de magnétisme. Au bout de 7 jours, la proportion de cellules magnétiques est identique en présence et en absence d'un champ. Les valeurs de Cmag diminuent légèrement et passent à 1,3. Le nombre de bactéries magnétiques estimé en microscopie diminuait également au bout de 7 jours.

Grâce à cette méthode, nous avons pu démontrer que les bactéries en suspension produisaient bien des magnétosomes au cours du temps et que le champ magnétique stimule la production des magnétosomes au bout de 2 jours.

5. Effet du milieu de culture sur le nombre de magnétosomes et l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique

L'orientation intrigante des chaînes de magnétosomes pour les bactéries encapsulées en présence d'un champ magnétique recèle encore quelques mystères. Est-ce que seuls les magnétosomes en formation peuvent s'orienter dans le champ ou bien les chaînes se déplaceraient au sein de la bactérie ? Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'encapsuler les bactéries dans un tampon phosphate supplémenté en glycérol sans fer. Les observations au MET ont été réalisées après 7 jours d'encapsulation en présence et en absence d'un champ magnétique.

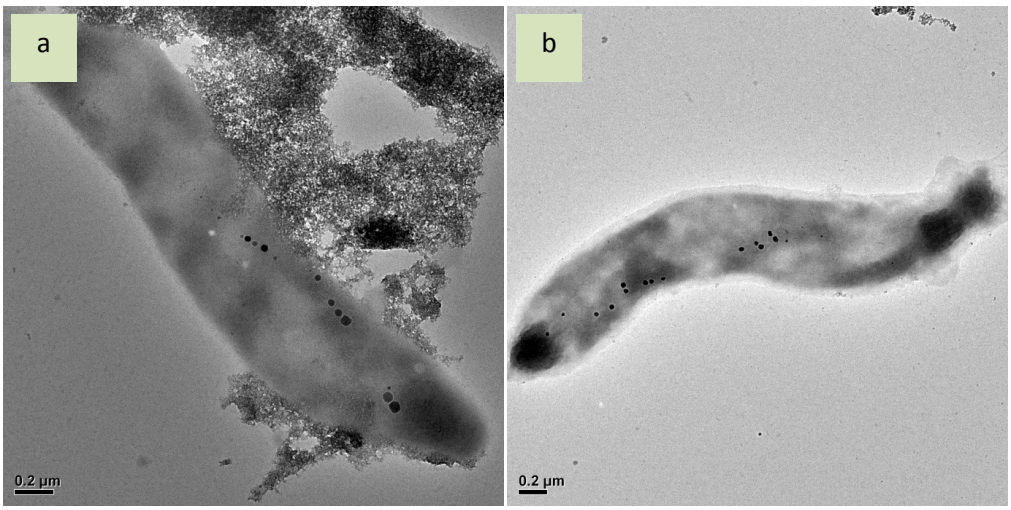
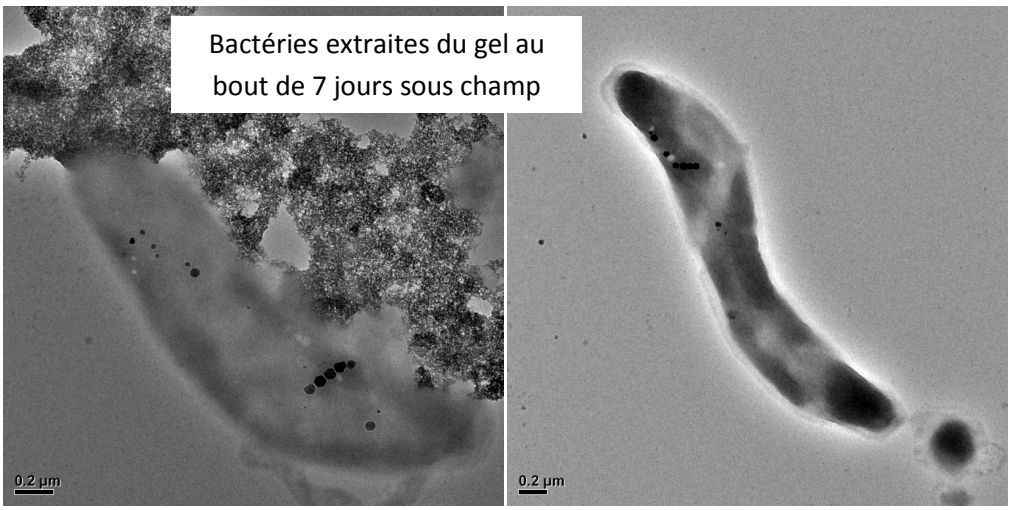


Figure 26 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)



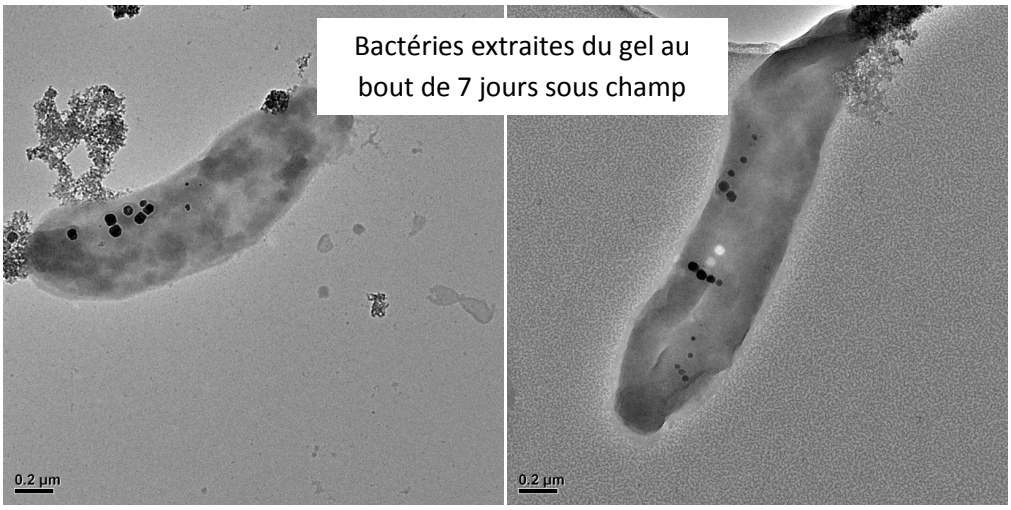


Figure 27 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Comme nous pouvons le constater, les bactéries exposées au champ magnétique présentent de nouveau des chaînes orientées de manière perpendiculaire (ou quasiment) (Fig. 27).

Certaines études ont montré que les filaments MamK se localisent parfois à des endroits différents des magnétosomes, suggérant ainsi que ces filaments pourraient servir de piste pour le mouvement et le positionnement des magnétosomes (Schliwa & Woehlke, 2003). Ces filaments prennent naissance à de multiples sites et leur polymérisation est très dynamique ; l'ensemble du réseau se réarrange continuellement. Cette dynamique des filaments pourrait donc expliquer cette grande flexibilité dans l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique lorsque le mouvement des bactéries est empêché.

Les observations des chaînes situées perpendiculairement à la bactérie suggèrent que les magnétosomes déjà formés avant l'encapsulation pourraient s'orienter dans les lignes de champ. Toutefois, le mouvement des magnétosomes pourrait seulement s'effectuer que s'ils ne sont pas liés à la membrane. La présence de courtes chaînes nous montre que les magnétosomes sont liés au filament MamK permettant ainsi leur stabilisation en chaîne tout en évitant leur agglomération. La rotation de la chaîne nécessiterait probablement qu'un magnétosome soit encore fixé à la membrane sous forme d'invagination pour éviter que les chaînes ne se déplacent dans la cellule et qu'elles se rassemblent entre elles en raison des interactions dipolaires comme nous pouvons voir dans la photo B ci dessous.

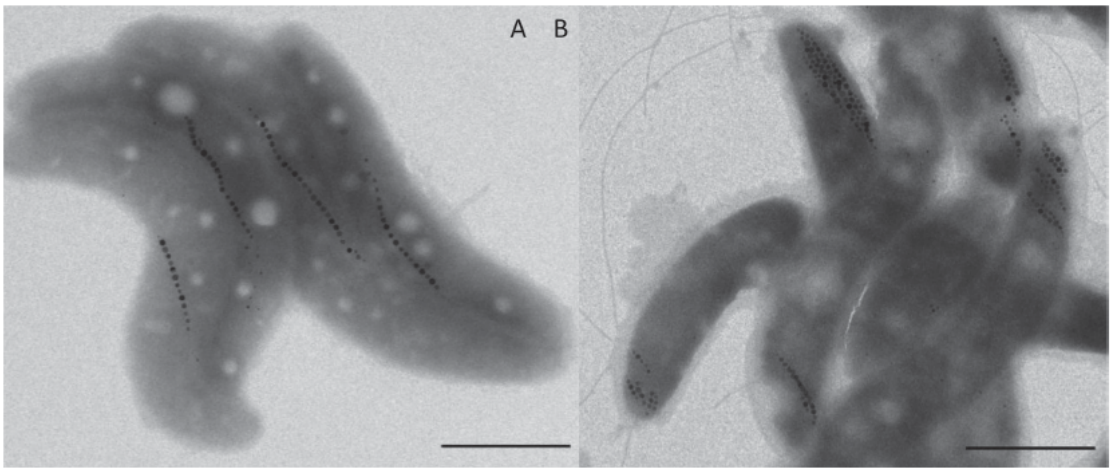


Figure 28 : Images TEM des cellules MSR-1 wildtype (A) et ΔmamJ (B) séchées en présence d'un champ magnétique (barre d'échelle : 1 µm) (Körnig *et al.*, 2014)

Selon l'article de Körnig *et al.,* 2014, les bactéries MSR-1 ont été séchées en présence d'un champ magnétique de 100 mT. Pour la souche wild-type (photo A) présentant des magnétosomes liés au filament MamK, les magnétosomes ne se déplaçaient pas dans la cellule, seules les bactéries s'orientaient dans les lignes de champ (Fig. 28). Par contre, les cellules mutantes dont le gène mamJ a été délété ne s'orientaient pas dans les lignes de champ (photo B). La délétion du gène conduit à des magnétosomes non liés au filament MamK, ce qui provoque un déplacement des particules dans la cellule. Comme nous pouvons voir sur la photo B, les magnétosomes peuvent se rassembler en raison des interactions dipolaires et s'alignent dans les lignes de champ.

Le rassemblement (agglomération) des magnétosomes entre eux n'a jamais été observé dans notre situation ce qui pourrait donc s'expliquer par la présence du filament MamK reliant les magnétosomes en chaîne et une fixation à la membrane pour éviter les interactions entre les chaînes.

Malgré ces observations, il serait tout autant probable que des magnétosomes en formation s'orientent directement dans le sens des lignes de champ et que le filament MamK les collecte progressivement pour former une chaîne. Cette étude devrait donc être plus approfondie pour pouvoir comprendre les phénomènes réels s'exerçant sous l'application d'un champ magnétique.

D'après les photos MET, nous avons pu déterminer le nombre de magnétosomes par cellule. Sur 18 bactéries observées après encapsulation en absence d'un champ et 35 en présence d'un champ, celles-ci contenaient en moyenne 12 +/- 4 magnétosomes.

C. Etude des phénomènes de biominéralisation sur des bactéries encapsulées avec des magnétosomes

Les bactéries cultivées pendant 7 jours en présence de fer pour permettre la production des magnétosomes ont été centrifugées puis resuspendues dans du milieu concentré avec 300 µM de fer. Les bactéries en suspension ont ensuite été encapsulées dans les gels de silice puis exposées à un champ magnétique pendant 7 jours. Des suspensions contrôles ont également été préparées afin de déterminer l'effet de l'encapsulation sur la production des magnétosomes. L'idée principale était de déterminer l'effet du champ sur des cellules magnétiques et de voir si ces cellules pouvaient augmenter leur nombre de magnétosomes intracellulaires lorsque celles-ci sont remises dans un milieu riche en fer. Les bactéries ont seulement été observées au MET au bout de 7 jours.

1. Observation des bactéries par microscopie électronique en transmission pour l'étude des phénomènes de biominéralisation

a) *Suspension initiale avant l'encapsulation*

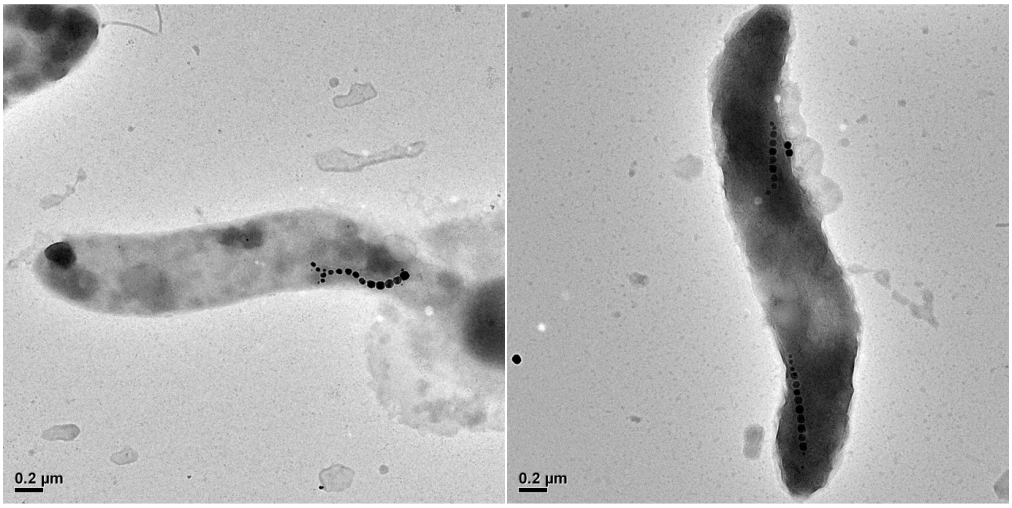


Figure 29 : Bactéries issues de la suspension initiale avant l'encapsulation. Bactéries préalablement cultivées en présence de quinate de fer pour permettre la production des magnétosomes

Comme nous pouvons voir dans la figure 29, les bactéries en suspension avant l'encapsulation présentent parfois deux chaînes de magnétosomes. Les nanoparticules superparamagnétiques se trouvent souvent en bout de chaîne.

b) *Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation*

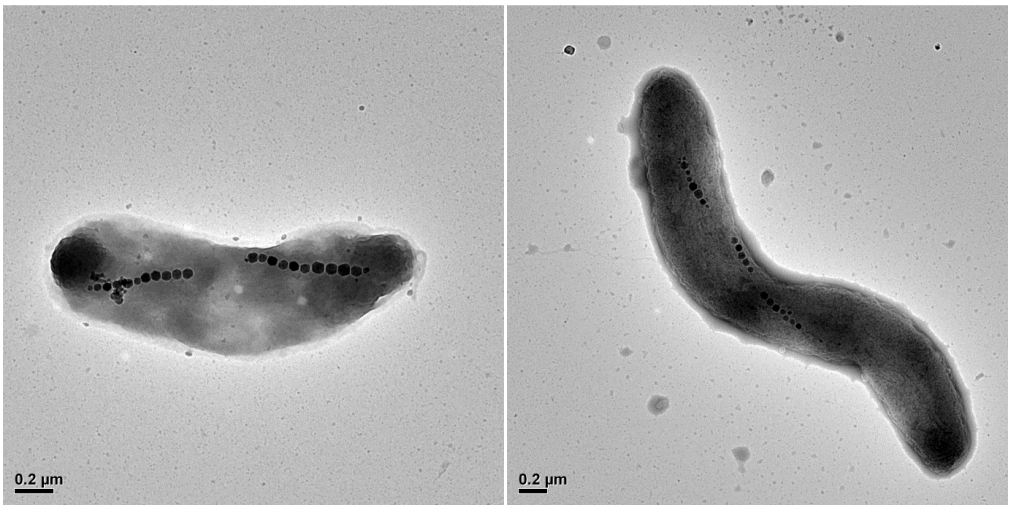


Figure 30 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en absence d'un champ

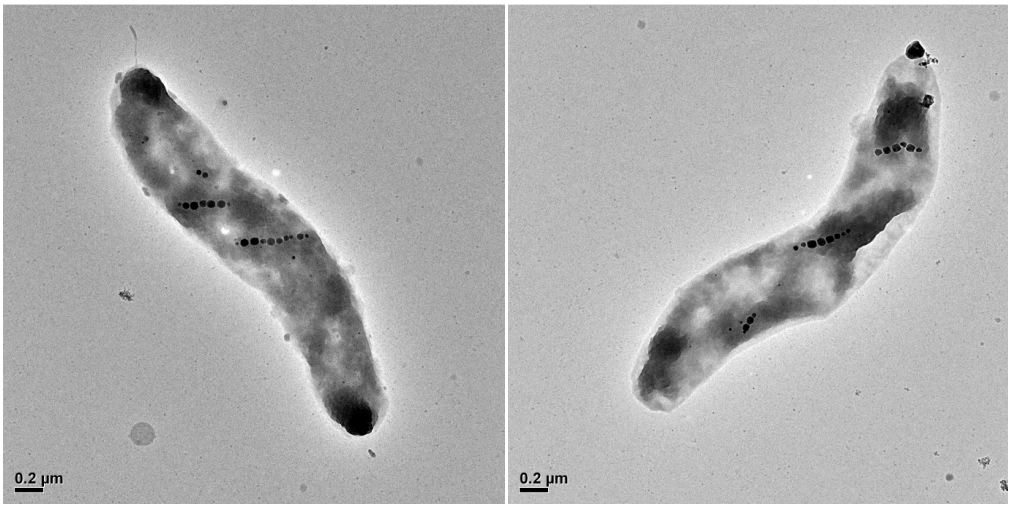


Figure 31 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Les bactéries exposées au champ magnétiques pendant 7 jours présentaient plusieurs chaînes disposées entre elles de manière parallèle et situées presque perpendiculairement à l'axe longitudinal de la bactérie. Dans la figure 31, nous pouvons constater que les chaînes presque perpendiculaires à la bactérie contiennent entre 6 et 10 magnétosomes répartis presque sur toute la largeur de la cellule. Cependant d'autres cas de figures ont pu être observés comme nous pouvons voir sur les images ci-dessous.

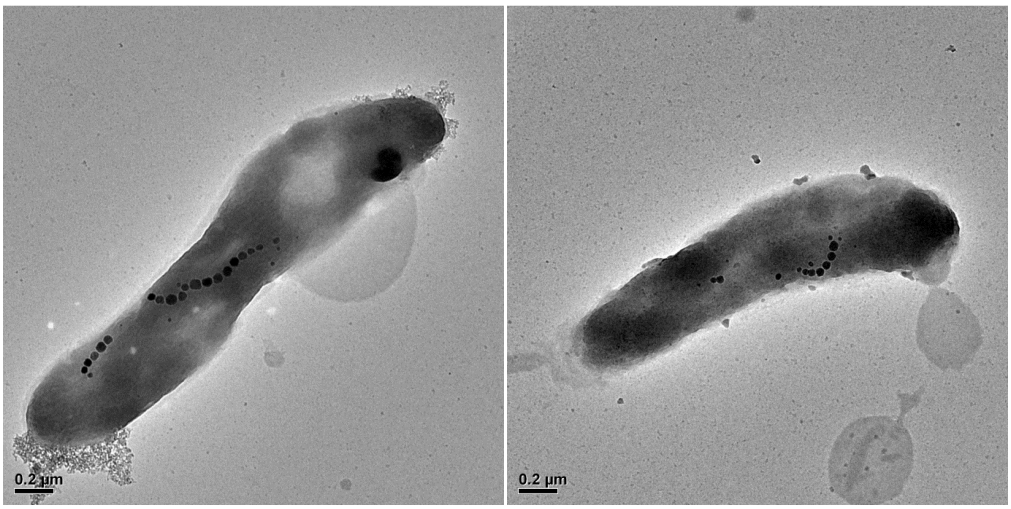


Figure 32 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Certaines bactéries possédaient des chaînes légèrement distordues suggérant que seuls les magnétosomes sous forme de vésicules détachées de la membrane pourrait s'orienter dans le champ tandis que le reste de la chaîne serait probablement fixé à la membrane sous forme d'invagination (Fig. 32).

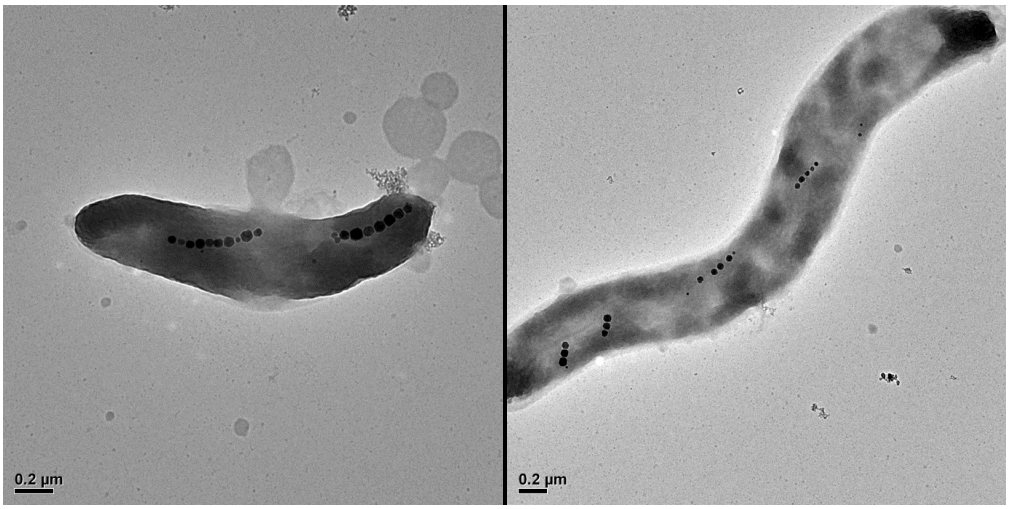


Figure 33 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Sur l'image de gauche de la figure 33, nous pouvons observer une bactérie dont les chaînes des magnétosomes sont situées le long de l'axe longitudinal. La préservation des chaînes montrent que le champ magnétique n'a pas eu d'effet sur les particules biogéniques, ce qui suggère que la bactérie aurait pu être positionnée dans le sens des lignes de champ. Sur l'image de droite, nous pouvons constater que deux courtes chaînes se sont orientées dans le sens des lignes de champ et que deux autres petites chaînes sont restées disposées le long de la bactérie. Ce cas de figure illustre parfaitement que même si une bactérie se trouve piégée perpendiculairement aux lignes de champ

magnétique, les chaînes de magnétosomes préexistantes ou en formation ne s'orientent pas toujours dans le champ et que ce mécanisme d'orientation suggère que seules les vésicules des magnétosomes détachés de la membrane peuvent s'orienter.

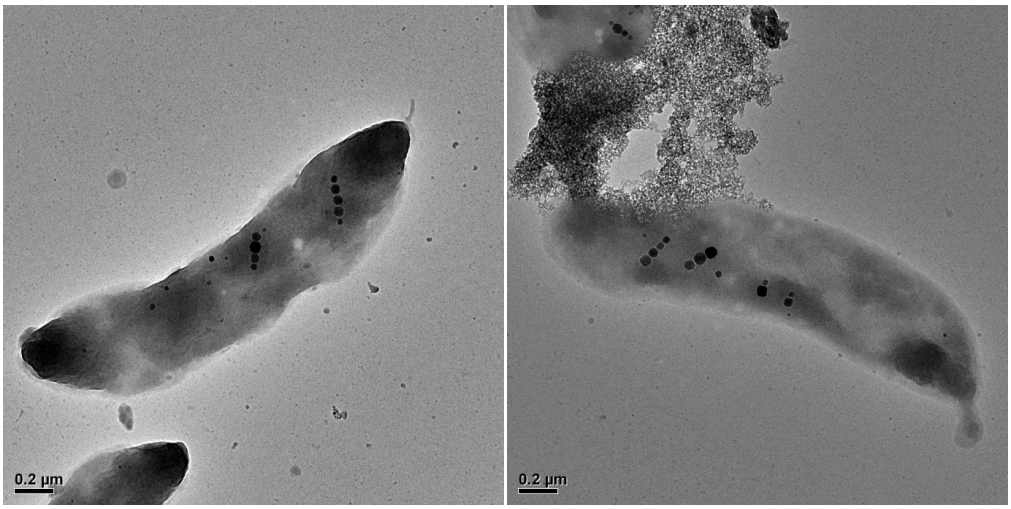


Figure 34 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Ces dernières images nous montrent des bactéries avec de courtes chaînes (de 3 à 5 magnétosomes) s'orientant toutes dans le sens des lignes du champ (Fig. 34).

Pour les bactéries encapsulées dans les matrices de silice en présence d'un champ magnétique, 22 % possédaient plusieurs chaînes de magnétosomes inclinées. Nous pouvons donc voir que le champ magnétique influence également l'orientation des magnétosomes pour les bactéries encapsulées avec des magnétosomes. La déviation des chaînes dans les lignes de champ est plus fréquente que pour des cellules encapsulées sans magnétosomes. Mises à part les modifications dans l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique, aucune différence n'a été constatée par rapport aux bactéries dans la suspension initiale et celles encapsulées en absence d'un champ magnétique.

c) *Bactéries en suspension au bout de 7 jours*

Afin de déterminer l'effet de l'encapsulation sur la formation des magnétosomes, nous avons observé des bactéries en suspension au bout de 7 jours.

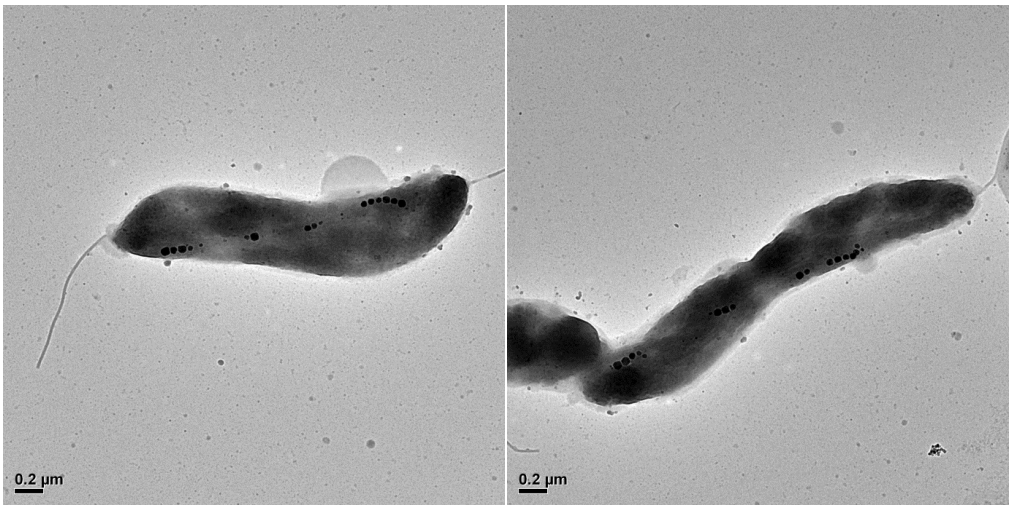


Figure 35 : Bactéries en suspension au bout de 7 jours en absence d'un champ

d) *Bactéries en suspension au bout de 7 jours sous champ magnétique*

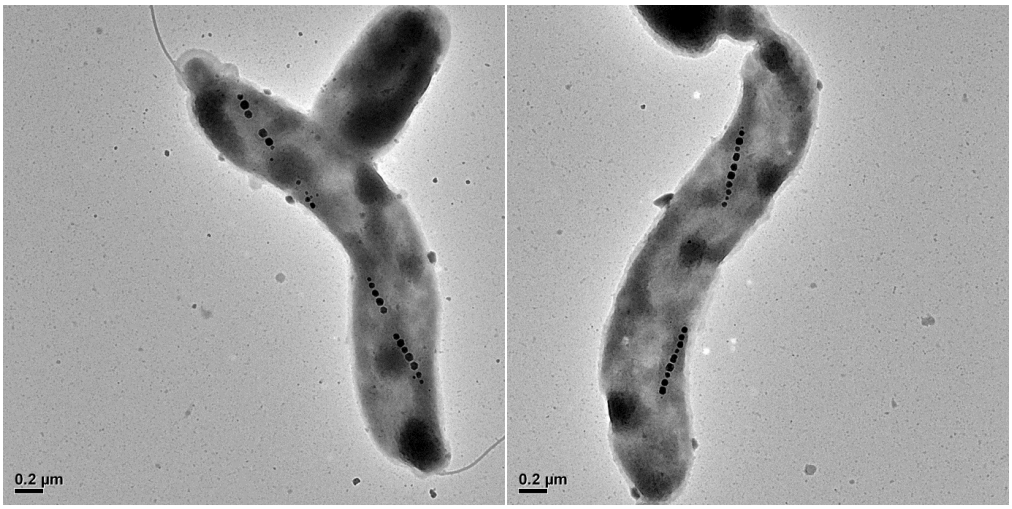


Figure 36 : Bactéries en suspension au bout de 7 jours en présence d'un champ

Nous pouvons constater que pour les bactéries en suspension, il n'y a pas d'effets visibles du champ magnétique et que ces bactéries présentent les mêmes caractéristiques que celles issues de la suspension initiale et celles encapsulées en absence d'un champ magnétique (Fig. 35 et 36).

e) *Conclusion sur les observations au MET*

D'une manière générale, les bactéries magnétotactiques AMB-1 utilisées pour ces expériences et cultivées en conditions normales en présence de fer, présentent plusieurs chaînes, les plus grosses particules étant de forme cubo-octaédrique. Les magnétosomes immatures (superparamagnétiques) se trouvent en bout de chaîne et souvent non alignés. Nous avons pu constater qu'il existe plusieurs sites de nucléation, ce qui montre que le chargement des vésicules se ferait en parallèle. En bout de chaîne, on observe parfois 2 à 3 nanoparticules superparamagnétiques autour d'un magnétosome mature. Aucun effet du champ magnétique n'a été observé sur les bactéries en suspension au bout de 7 jours alors qu'un champ affecte l'orientation des chaînes pour les cellules piégées dans les matrices.

2. Effet du champ magnétique sur le nombre de magnétosomes intracellulaires

Une étude comparative sur le nombre de magnétosomes au sein des cellules a été menée pour des bactéries exposées ou non au champ magnétique.

Tableau 10 : Nombre de magnétosomes pour les cellules encapsulées ou en suspension au bout de 7 jours

		Nombre de NPs/cellule	
Temps (jours)	Encapsulation ou suspension	Absence de champ	Sous champ
7	Encapsulées	15 +/-6 (n = 51)	13 +/-5 (n = 51)
7	En suspension	13 +/- 5 (n =23)	16 +/- 6 (n =25)

D'après le tableau 10, nous pouvons constater que pour toutes les conditions, le nombre de magnétosomes, si l'on tient compte des écarts-types, n'augmente pas en présence d'un champ que ce soit pour les bactéries encapsulées ou en suspension au bout de 7 jours. Le nombre moyen de magnétosomes pour la suspension initiale avant l'encapsulation était de 14 +/-6 sur 28 bactéries observées. Cette moyenne se rapproche des valeurs déterminées dans le tableau 10, ce qui nous montre clairement qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de magnétosomes malgré l'apport en fer dans les gels et les suspensions. D'après ces résultats, nous pouvons constater que le champ magnétique n'augmente pas le chargement en magnétosomes au sein d'une bactérie. Ces observations confortent les résultats obtenus pour les expériences réalisées avec des bactéries initialement introduites sans magnétosomes (cf. partie II-B-3).

3. Effet du champ magnétique sur la viabilité des cellules

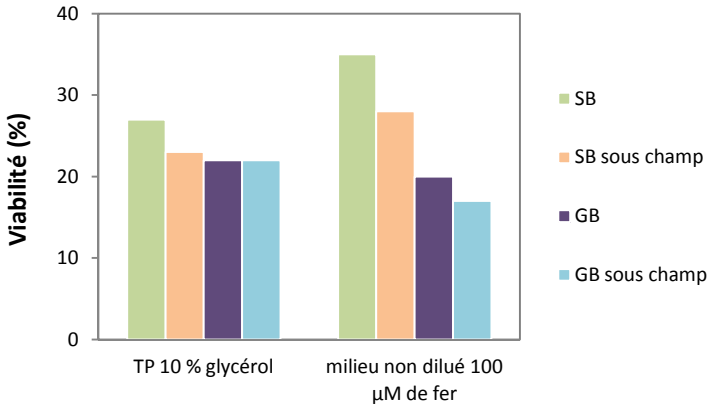


Figure 37 : Viabilité des bactéries encapsulées dans les matrices de silice et en suspension en présence et en absence d'un champ magnétique après 7 jours (expérience réalisée une fois)

La viabilité des cellules encapsulées et en suspension a été déterminée au bout de 7 jours en présence de fer (milieu de culture) et en absence de fer (tampon phosphate avec du glycérol) (Fig. 37). Nous pouvons constater qu'il n'y a pas d'effets visibles de l'encapsulation, du milieu de culture ni du champ magnétique.

4. Suivi de la production des magnétosomes dans les gels de silice par VSM

Comme nous avons pu voir dans le chapitre précédent, les propriétés magnétiques des magnétosomes contenus dans les cellules encapsulées dans les gels, ont pu être déterminées par une mesure d'aimantation au VSM. Afin de voir si les bactéries produisaient des magnétosomes dans les gels, nous avons donc encapsulé des cellules magnétiques dans les matrices contenant 100 µM de fer. Des mesures magnétiques ont été réalisées à t=1h (contrôle) et au bout de 7 jours d'encapsulation en présence et en absence d'un champ (Fig. 38).

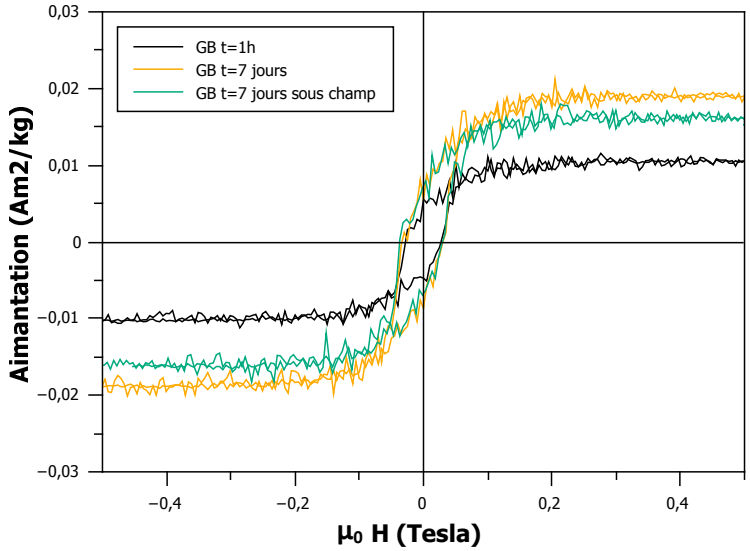


Figure 38 : Courbe d'aimantation des gels contenant des bactéries avec des magnétosomes

D'après les cycles d'hystérésis obtenus, nous pouvons constater que l'aimantation à saturation augmente au bout de 7 jours d'encapsulation en présence et en absence d'un champ magnétique. Elle passe donc de 0,011 (+/- 0,001) (t=1h) à 0,019 (+/- 0,003) pour les cellules non exposées et 0,016 (+/- 0,003) pour les bactéries exposées au champ au bout de 7 jours. Une augmentation de la valeur d'aimantation à saturation reflète une élévation du nombre de particules magnétiques et par conséquent une production de magnétosomes dans les gels. Nous pouvons constater cependant que les valeurs sont très faibles. En effet, étant donné que les bactéries sont encapsulées, celles-ci ne se divisent pas ou très peu. Nous avons pu voir précédemment que le nombre de magnétosomes n'augmentait pas dans les cellules en présence et en absence d'un champ magnétique par rapport aux bactéries issues de la suspension initiale avant l'encapsulation. L'augmentation du nombre de magnétosomes ne peut donc se faire que par la faible fraction de cellules non magnétiques. En effet, comme dans chaque culture il y a toujours une fraction de bactéries sans magnétosomes, celles-ci pourraient donc produire des particules dans les gels. D'après le tableau 11, nous pouvons constater que les valeurs de champ coercitif (Hc et Hcr), augmentent au bout de 7 jours. Ce phénomène pourrait être lié à une augmentation de la taille des particules biogéniques au cours du temps.

Tableau 11 : Valeurs de Ms, Hcr, Hc et Hcr/Hc pour les gels avec des bactéries encapsulées avec des magnétosomes

	Ms (Am^2/kg)	Hcr (mT)	Hc (mT)	Hcr/Hc
GB t=1h	0,011 (+/- 0,001)	28 (+/- 0,6)	35 (+/- 0,7)	0,8
GB t=7 jours	0,019 (+/- 0,003)	33 (+/- 0,7)	40 (+/- 0,8)	0,8
GB t=7 jours champ	0,016 (+/- 0,003)	33 (+/- 0,7)	39 (+/- 0,8)	0,8

5. Effet du milieu de culture sur le nombre de magnétosomes et l'orientation des chaînes en présence d'un champ magnétique

L'étude précédente sur des bactéries encapsulées sans magnétosomes dans une matrice de silice en absence de fer (dans du tampon phosphate supplémenté en glycérol), nous avait permis de voir que les chaînes de magnétosomes pouvaient s'orienter dans le champ magnétique (cf. partie II-B-5). Nous avons donc de nouveau réalisé la même expérience mais en encapsulant des bactéries qui possédaient déjà des magnétosomes.

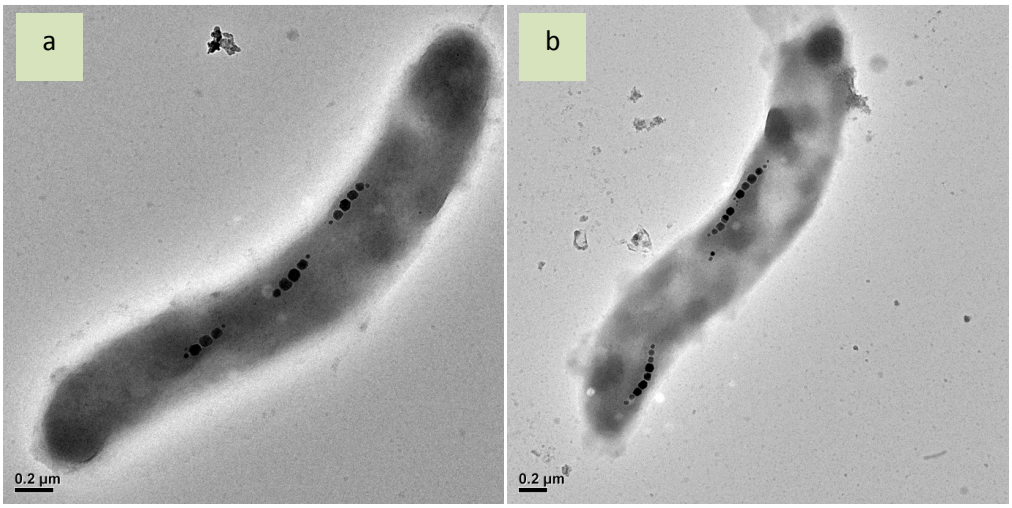


Figure 39 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en absence de champ (a) et en présence d'un champ (b)

En comparant une bactérie non exposée au champ magnétique avec une piégée en présence d'un champ, nous pouvons constater que celles-ci ne présentent aucune différence (Fig. 39).

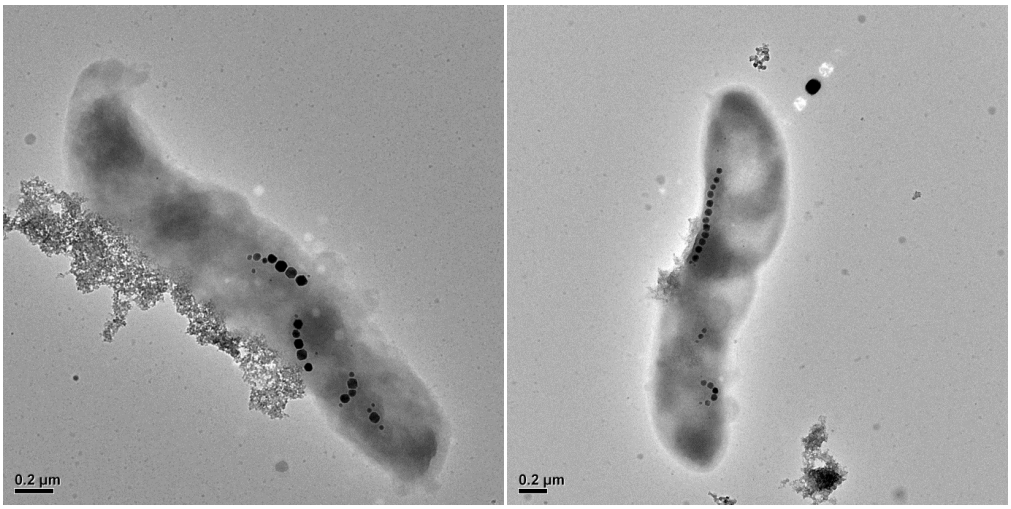


Figure 40 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Toutefois, certaines bactéries encapsulées en absence de fer présentaient parfois des chaînes distordues, suggérant ainsi une orientation des magnétosomes non fixés à la membrane tandis que d'autres restent fixés (Fig. 40). Nous pouvons également observer qu'au sein d'une bactérie, certaines chaînes se trouvent alignées dans l'axe longitudinal tandis que d'autres s'orientent transversalement à la bactérie.

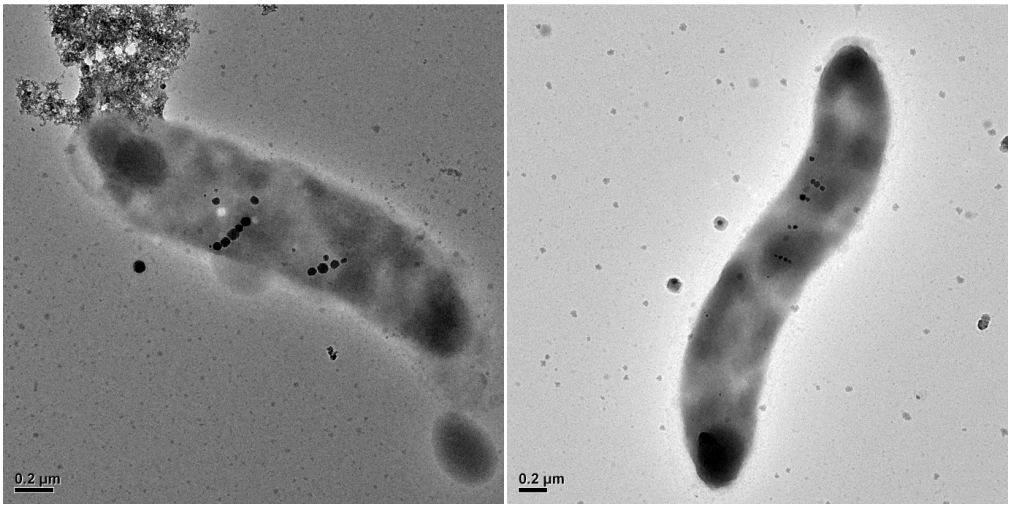


Figure 41 : Bactéries extraites des gels après 7 jours d'encapsulation en présence d'un champ

Dans d'autres situations, nous pouvons observer des chaînes de magnétosomes plus ou moins longues alignées dans les lignes du champ magnétique (Fig. 41). Toutes ces observations nous montrent que les bactéries encapsulées dans des gels sans fer vont être affectées par le champ magnétique et ce de manière très similaire aux bactéries encapsulées en présence de fer.

Sur 39 bactéries observées après encapsulation et évolution en absence d'un champ magnétique, le nombre moyen de magnétosomes était de 14+/-5 tandis que sur 46 bactéries encapsulées exposées au champ, celles-ci contenaient en moyenne 13 +/- 5 nanoparticules. Il n'existe donc aucune différence significative. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus pour les cellules encapsulées en présence de fer.

D. Effet des matrices à base de nanoparticules de magnétite monodomaines sur les processus de biominéralisation

1. Procédé d'encapsulation

Les bactéries ont été cultivées de manière à obtenir des cellules magnétiques et non magnétiques puis ont été centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture concentré et contenant 300 µM de fer. Le protocole d'encapsulation des bactéries est identique à celui décrit dans le chapitre 2. Les bactéries sont ajoutées après neutralisation de la suspension de silicate de sodium et de nanoparticules de magnétite de 32 ou 45 nm. Les gels obtenus sont alors laissés 15 min pour qu'ils soient suffisamment rigides avant de les placer pendant 15 min sous un champ magnétique de 80 mT. En effet, l'application d'un champ magnétique extérieur permet d'aimanter les particules magnétiques presque jusqu'à leur saturation afin qu'elles acquièrent une aimantation rémanente à température ambiante. Après 15 min d'exposition, les gels sont placés en dehors du champ. Les observations microscopiques ont seulement été réalisées au bout de 7 jours d'encapsulation. Ces études permettront de voir l'effet d'un champ magnétique interne aux gels sur le processus de biominéralisation.

2. Observation en microscopie électronique en transmission

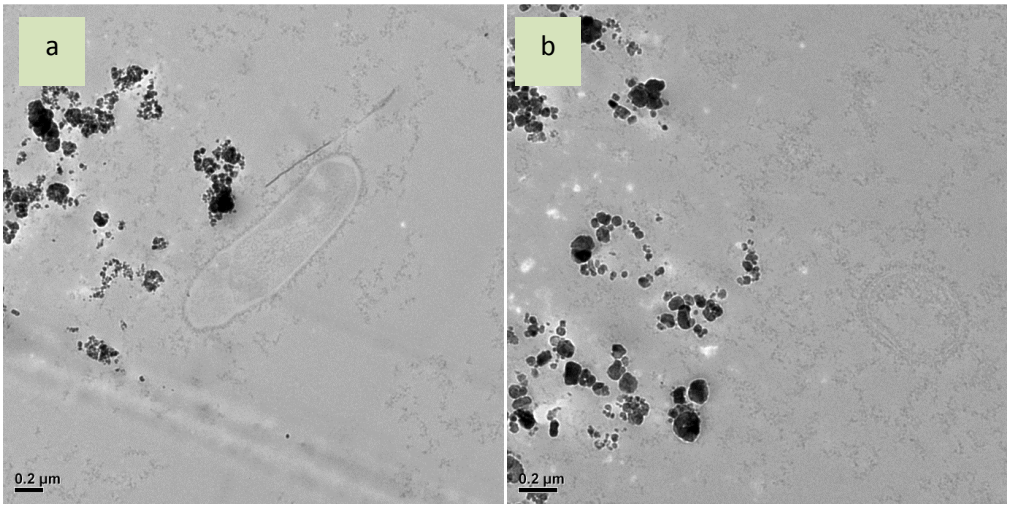


Figure 42 : Bactéries encapsulées dans des gels de silice conçus avec une suspension à 10 g/l de magnétite de 32 nm (a) et 5 g/l de magnétite de 45 nm (b) au bout de 24h d'encapsulation

Les bactéries encapsulées dans des matrices conçues avec une suspension à 10 g/l de nanoparticules de magnétite de 32 nm et 5 g/l de magnétite de 45 nm présentent une bonne intégrité membranaire (Fig. 42).

a) *Effet des particules de 32 et 45 nm sur les bactéries encapsulées sans magnétosomes*

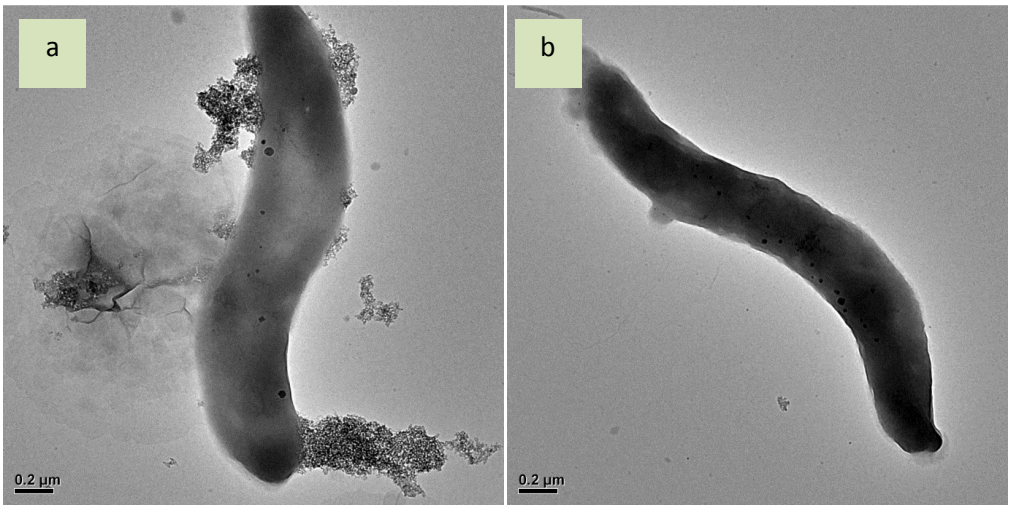


Figure 43 : Bactéries extraites des gels contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm (a) et 45 nm (b) après 7 jours d'encapsulation

Selon la figure 43, nous pouvons constater que les cellules non magnétiques encapsulées en présence de fer dans des gels magnétiques (avec des nanoparticules de magnétite de 32 et 45 nm) ne présentent pas de différences notables au bout de 7 jours d'encapsulation.

b) *Effet des particules de 32 nm sur les bactéries encapsulées avec des magnétosomes*

Afin de voir les effets potentiels des gels magnétiques, des bactéries contenant des magnétosomes ont été également encapsulées dans les deux types de matrice en présence de fer pendant 7 jours.

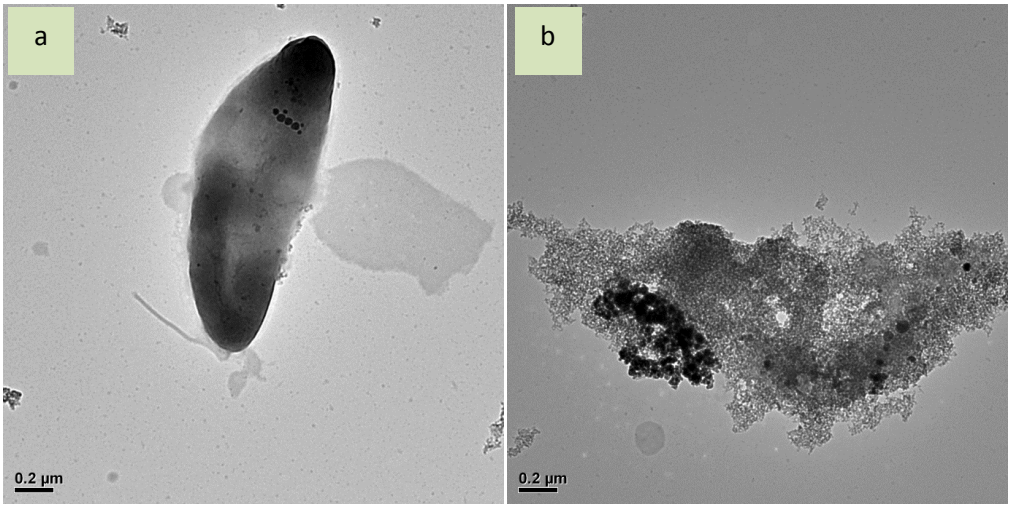


Figure 44 : Bactéries extraites du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm (a) et réseau de silice contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm agrégées (b)

Comme nous pouvons constater sur la figure 44, une bactérie a pu être observée avec une chaîne de magnétosomes orientée transversalement dans la cellule (a). La photo de droite (b) montre des particules de magnétite agrégées dans le gel de silice.

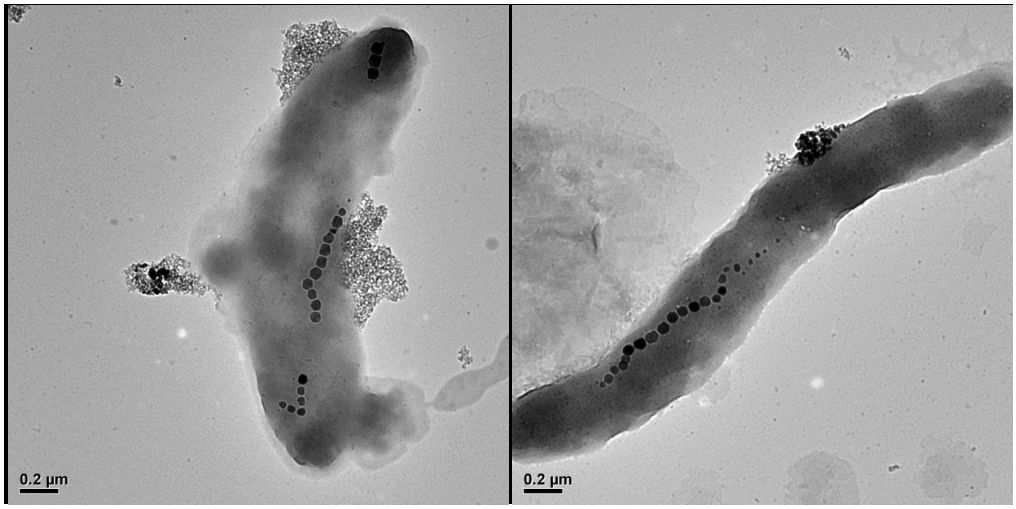


Figure 45 : Bactéries extraites du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm

Dans les photos ci-dessus, les bactéries présentent parfois des chaînes légèrement distordues (Figure 45).

D'après toutes ces observations, nous pouvons constater que les chaînes de magnétosomes sont parfois légèrement distordues ou perpendiculaires à la bactérie. Toutefois une seule bactérie a été observée avec une chaîne perpendiculaire contenant des petites nanoparticules. Cependant, malgré ces observations, nous nous sommes interrogés sur l'effet potentiel du champ magnétique extérieur appliqué pendant 15 min sur les gels bactériens directement après l'encapsulation des cellules. Etant donné que ces expériences ont été menées très tardivement à la fin de ma thèse, il n'était pas possible de vérifier si l'effet était lié aux nanoparticules de magnétite ou bien au champ magnétique extérieur appliqué sur une courte durée. Nous avons tout de même décidé de montrer quelques photos des bactéries encapsulées dans les gels de silice contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm. En effet, celles-ci présentaient d'autres particularités encore non observées jusqu'à présent.

c) *Effet des nanoparticules de 45 nm sur les bactéries encapsulées avec des magnétosomes*

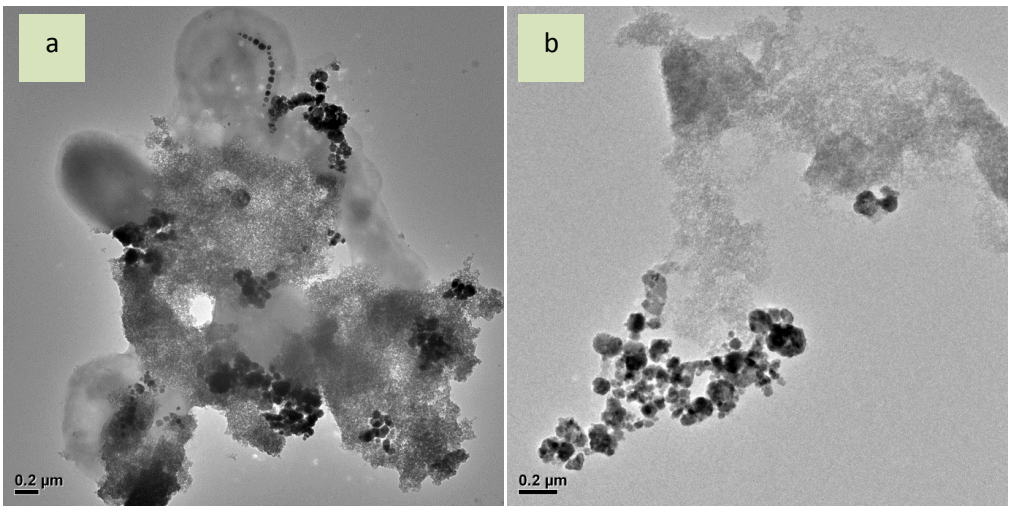


Figure 46 : Bactéries piégées dans de la silice contenant des agrégats de nanoparticules de magnétite de 45 nm (a) et zoom sur des nanoparticules de 45 nm agrégées dans la silice (b)

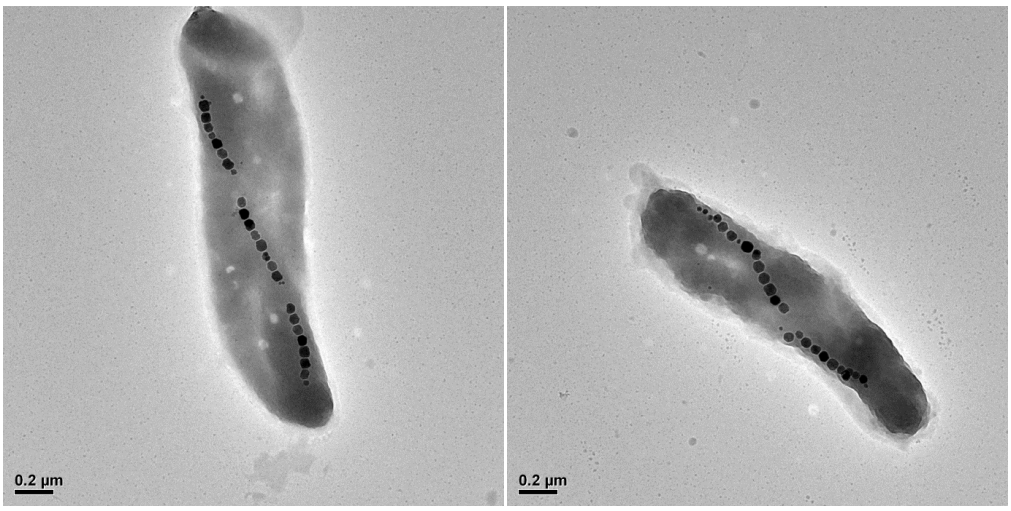


Figure 47 : Bactéries extraites du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm

Dans la figure 47, nous pouvons voir des bactéries non affectées par le champ magnétique. Elles présentent de très longues chaînes avec des magnétosomes de forme cubo-octaédrique.

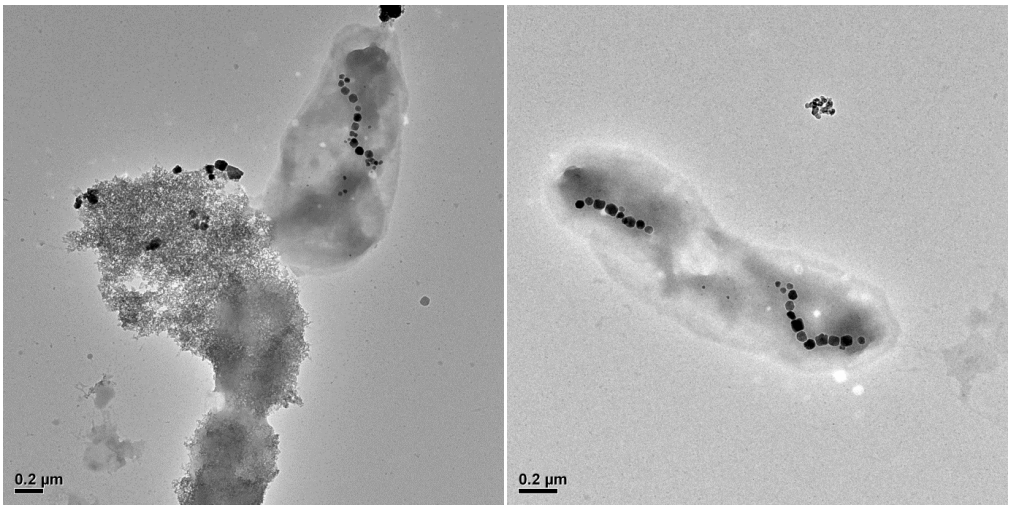


Figure 48 : Bactéries extraites du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm

Dans le cas suivant, nous pouvons constater que certaines bactéries possèdent des chaînes très distordues de manière plus conséquente que pour les bactéries piégées dans les matrices contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm (Fig. 48).

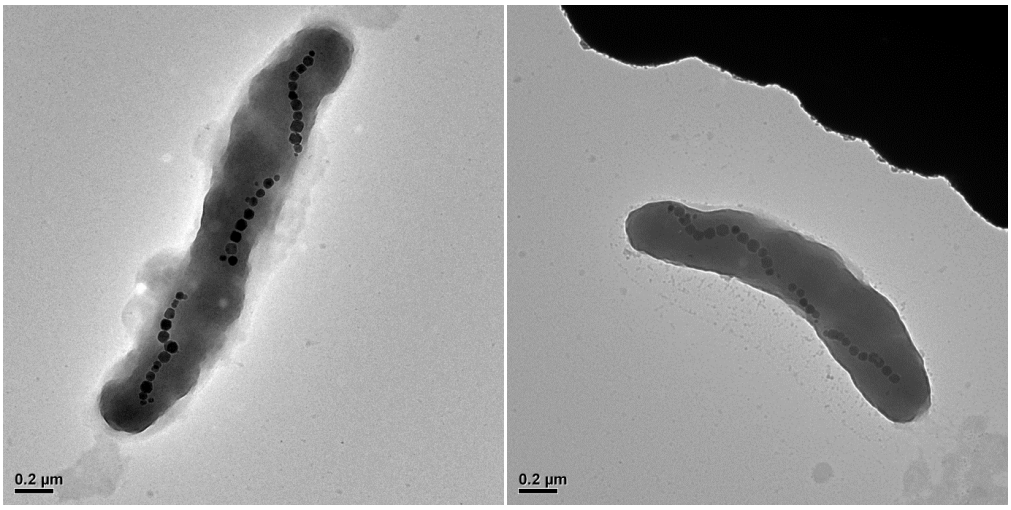


Figure 49 : Bactéries extraites du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm

Les bactéries possédaient parfois des chaînes très longues et distordues comme nous le montre la figure 49. Ces distorsions sont également plus marquées que dans les gels contenant de la magnétite de 32 nm. Ces observations pourraient suggérer un effet plus marqué dans les gels contenant de la magnétite de 45 nm.

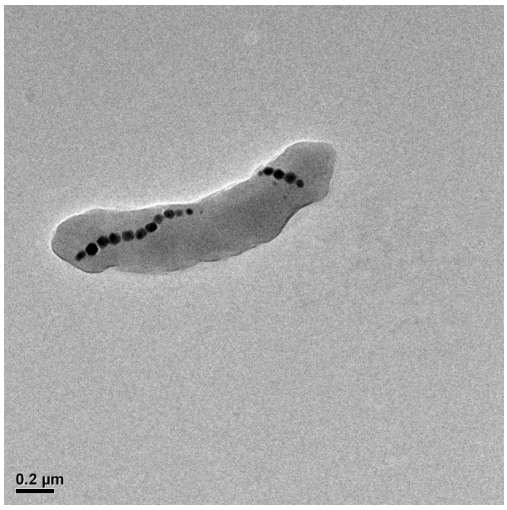


Figure 50 : Bactérie extraite du gel contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm

Comme nous pouvons le constater, les bactéries encapsulées dans les matrices de silice contenant des nanoparticules de magnétite de 45 nm, possèdent parfois de très longues chaînes. Celles-ci sont souvent distordues voire même orientées perpendiculairement dans un des cas (Fig. 50). La présence d'agrégats de nanoparticules magnétiques synthétiques pourrait affecter légèrement les chaînes de magnétosomes. Toutefois, la présence de chaînes distordues peut également s'expliquer par l'apparition de grosses vésicules dans les cellules. Les chaînes vont donc contourner les vésicules, ce qui produit une légère distorsion. D'autres études complémentaires pourraient confirmer ces résultats même si ces distorsions n'ont pas été observées pour d'autres cellules encapsulées dans les matrices de silice. Une éventuelle contribution du champ magnétique statique appliqué pendant 15 min devrait également être explorée afin de pouvoir affirmer d'un effet lié à la matrice contenant des nanoparticules de magnétite.

Dans le tableau ci-dessous sont présentés le nombre moyen de magnétosomes pour les bactéries encapsulées dans les gels avec des nanoparticules de magnétite de 32 et 45 nm.

Tableau 12 : Nombre de magnétosomes par cellule pour les gels avec des particules de 32 nm et 45 nm

		Nombre de NPs/cellule	
Temps (jours)	Types de cellules encapsulées	Gel 32 nm	Gel 45 nm
7	Avec magnétosomes	16 +/-5 (n = 44)	22 +/-7 (n = 36)
7	Sans magnétosomes	8 +/- 2 nm (n = 19)	9 +/- 4 nm (n = 26)

Parmi les bactéries encapsulées sans magnétosomes au départ, celles-ci présentent 8 magnétosomes en moyenne après 7 jours d'immobilisation dans les gels avec de la magnétite de 32

nm. Pour les gels avec de la magnétite de 45 nm, les bactéries contiennent 9 magnétosomes en moyenne. Les écarts types nous montrent qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de particules biogéniques dans les gels contenant des nanoparticules de 45 nm. Dans les gels avec de la magnétite à 32 nm, 20 % des cellules possédaient des magnétosomes tandis que le pourcentage de cellules magnétiques pour les gels avec la magnétite de 45 nm était de 29 %. Le nombre de cellules magnétiques reste à peu près constant dans les deux types de gels.

En ce qui concerne les bactéries encapsulées initialement avec des magnétosomes pendant 7 jours, le nombre de particules par cellules n'évolue pas différemment que ce soit en présence des nanoparticules de magnétite de 32 nm ou de 45 nm, si l'on tient compte des écarts-types. Comme la suspension initiale avant encapsulation contenait 18 +/-6 magnétosomes par cellule, nous pouvons voir que malgré l'apport en fer dans les gels et la présence des nanoparticules de magnétite qui pourraient apporter une autre source de fer, les bactéries n'augmentent pas leur chargement en magnétosomes après 7 jours.

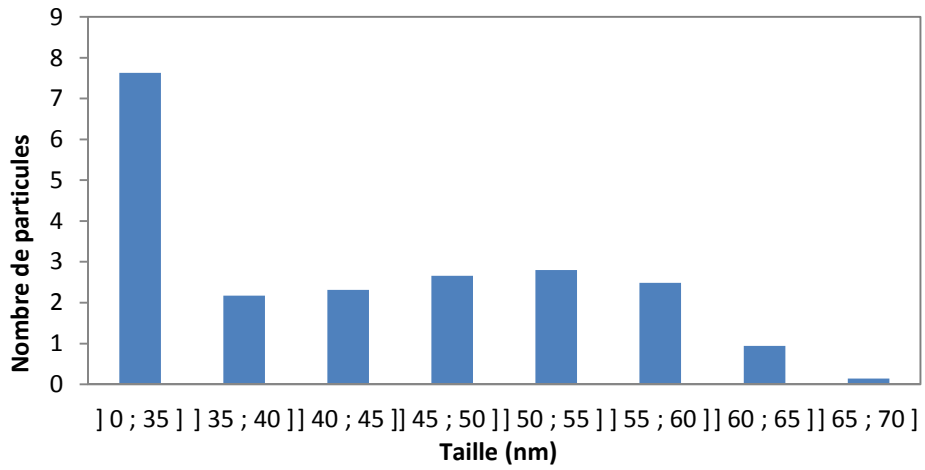


Figure 51 : Répartition de taille des magnétosomes pour les bactéries encapsulées dans les gels avec des nanoparticules de magnétite de 45 nm

La figure 51, nous montre la répartition en taille des nanoparticules biogéniques pour les bactéries encapsulées avec des magnétosomes dans les gels avec la magnétite de 45 nm. Nous pouvons constater que les bactéries possèdent en moyenne 13 nanoparticules matures (de taille supérieure à 35 nm) soit 63 % et 8 magnétosomes immatures soit 37 %. Les bactéries possèdent parfois de gros magnétosomes de taille supérieure à 60 nm.

III. Bilan

Au cours de ce chapitre, nous avons décrit deux principaux axes : l'optimisation des conditions expérimentales pour le suivi des processus de biominéralisation et l'effet du champ magnétique sur les bactéries encapsulées et en suspension. L'élaboration des protocoles expérimentaux avant l'étude sur les processus de biominéralisation était une étape essentielle pour ne sélectionner que les conditions les plus appropriées pour mener à bien les études de viabilité des cellules et les études sur l'effet du champ magnétique sur une durée de 3 mois.

Optimisation des conditions expérimentales pour le suivi des processus de biominéralisation

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de culture des bactéries afin d'obtenir des cellules sans magnétosomes pouvant de nouveau minéraliser des cristaux de magnétite une fois placées dans des conditions appropriées (en micro-oxie avec du quinate de fer). Les bactéries ont alors été cultivées pendant 2 jours en absence de quinate de fer puis après centrifugation, celles-ci ont été resuspendues dans différents milieux de culture (dilués ou non en présence de 20 ou 100 µM de fer) afin de déterminer la composition du milieu la plus adaptée pour pouvoir favoriser la biominéralisation. Ainsi, des suspensions ont été préparées de manière très similaire au gel en gardant la même teneur en NaCl mais en s'affranchissant seulement de la silice. Ces différents tests nous ont donc permis de suivre le taux de bactéries ayant produit des magnétosomes par une observation macroscopique des culots bactériens en présence et en absence d'un champ magnétique sur une période de 7 jours. Les résultats ont montré que le nombre de bactéries ayant produit des magnétosomes (culot plus important et plus sombre) était plus conséquent lorsque celles-ci se trouvaient dans les milieux non dilués en présence de 20 et 100 µM de fer. La présence d'un champ magnétique continu favorise la production des magnétosomes de manière anticipée. Suite à ces observations et après avoir pu constater que la viabilité des cellules était préservée pour toutes les conditions, nous avons choisi de ne sélectionner qu'un seul milieu pour mener la suite de nos expériences. Afin de s'assurer d'avoir un apport suffisant en fer pour permettre la production des magnétosomes, le choix le plus judicieux était de garder le milieu non dilué avec 100 µM de fer.

Effet du champ magnétique sur les bactéries encapsulées et en suspension

Avant de réaliser les tests de biominéralisation, un suivi de la viabilité des cellules en suspension et encapsulées a été réalisé après 1, 2, 4 et 7 jours en présence ou en absence d'un champ magnétique. Les résultats ont montré que la viabilité des bactéries n'était ni influencée par

l'encapsulation ni par la présence d'un champ magnétique. Après 7 jours, environ 40 % des bactéries restaient viables dans les gels et les suspensions. Ces conditions étaient donc propices pour l'étude des processus de biominéralisation sur une période de 7 jours.

Les premières études sur les processus de biominéralisation ont été menées sur des bactéries encapsulées et remises en suspension après avoir été préalablement cultivées sans fer pour obtenir des cellules non magnétiques. En effet, l'étude sur des bactéries initialement introduites sans magnétosomes préexistants permet de voir l'effet direct du champ magnétique ou de l'encapsulation sur la production des magnétosomes au cours du temps. Les observations en microscopie (MET) ont montré qu'une faible fraction des bactéries (environ 20 %) issues de la suspension initiale possédait des magnétosomes et qu'il était difficile de les distinguer de ceux produits par les bactéries encapsulées ou en suspensions (contrôle). Que ce soit en présence ou en absence d'un champ magnétique, aucune différence n'a été constatée au niveau de la morphologie et du nombre de magnétosomes par cellule ainsi que sur leur arrangement en chaîne. Cependant, un phénomène très intriguant a pu être constaté sur des bactéries encapsulées en présence d'un champ magnétique. Au bout de 4 et 7 jours, certaines bactéries (en très faible nombre) possédaient des chaînes orientées perpendiculairement (ou presque) à l'axe longitudinal de la bactérie, suggérant ainsi que le champ magnétique pouvait moduler l'orientation des chaînes de magnétosomes pour les bactéries piégées. Les observations à l'échelle microscopique nous ont également permis de déterminer la fraction de cellules magnétiques au bout de 1, 2, 4 et 7 jours pour les bactéries encapsulées et dans les suspensions contrôles en présence ou en absence d'un champ magnétique. Parmi les effets observés en présence d'un champ magnétique, une stimulation de la production des magnétosomes (conclue par une augmentation du nombre de cellules magnétiques) a été constatée au bout d'1 jour d'encapsulation sous champ et au bout de 2 jours pour les bactéries en suspension. Pour les gels et les suspensions non exposées au champ magnétique, le nombre de bactéries contenant des magnétosomes a augmenté au bout de 4 jours. D'une manière générale, la fraction de cellules magnétiques était plus élevée dans les gels. Cette étude nous a permis de constater que la production des magnétosomes se déroulait de manière anticipée en présence d'un champ magnétique. Ces résultats ont pu être confortés par les mesures du coefficient de magnétisme (Cmag) sur des bactéries en suspension. La production des magnétosomes a été favorisée au bout de 2 jours sous exposition au champ magnétique (à raison de 2 mesures de Cmag sur 3 suggérant une augmentation du nombre de bactéries contenant des magnétosomes). Puis au bout de 4 et 7 jours, le taux de cellules magnétiques a augmenté de manière significative. La quantité de bactéries ayant produit des magnétosomes était très similaire en présence et en absence d'un champ. Cette étude montre que la biominéralisation se déroule de manière anticipée avant 4 jours sous l'effet d'un

champ magnétique mais qu'au final le nombre de bactéries ayant produit des magnétosomes reste identique en présence ou en absence d'un champ après 4 jours. Cela suggère qu'il existe une même fraction de cellules capables de produire de nouveau des magnétosomes que ce soit sous exposition ou non à un champ magnétique. Ces résultats nous ont permis de conclure que, pour les bactéries encapsulées et en suspension, le champ magnétique permettait de stimuler la production des magnétosomes qui se déroulait de manière anticipée par rapport aux cellules non exposées au champ magnétique. Une hypothèse possible pour expliquer ces observations serait un effet du champ sur la membrane cellulaire (diamagnétique) et sur les protéines membranaires qui seraient affectées et pourraient ainsi favoriser l'entrée du fer dans les cellules. Des études ont d'ailleurs suggéré qu'en présence d'un champ magnétique extérieur, les molécules de la membrane cellulaire pourraient entrer en mouvement, ce qui aurait un effet sur les canaux ioniques et sur la mobilité des ions à travers la membrane (Rosen A. D., 1993, 1994, 1996 ; Strasak *et al.,* 2002; Luciana & Luigi, 2005). Ce processus conduirait à une précipitation de la magnétite intracellulaire de manière plus anticipée. Une étude de la cinétique de transfert de fer du milieu vers la cellule, et du bilan du fer entre différents compartiments (magnétosomes et hors magnétosomes), en présence et absence de champ, serait intéressante pour discuter cette hypothèse.

Dans un second temps, les études ont été réalisées sur des bactéries préalablement cultivées en présence de quinate de fer pour permettre la production des magnétosomes. Les cellules magnétiques ont ensuite été encapsulées et remises en suspension dans les mêmes conditions que celles réalisées auparavant avec des cellules non magnétiques. Cette étude a permis notamment de voir si les bactéries encapsulées avec des magnétosomes préexistants, pouvaient augmenter leur chargement en nanoparticules (augmentation du nombre de magnétosomes au sein d'une même cellule) après 7 jours d'exposition ou non à un champ magnétique. L'idée était également de voir l'effet du champ magnétique sur des cellules magnétiques et notamment si les chaînes des magnétosomes pouvaient être orientées dans le sens des lignes de champ. Parmi les effets constatés en microscopie électronique, les bactéries piégées dans les matrices après 7 jours d'exposition au champ, présentaient des chaînes de magnétosomes orientées perpendiculairement ou presque à l'axe longitudinal de la cellule. La fréquence de ces bactéries aux chaînes désorientées était particulièrement plus importante que pour les bactéries encapsulées sans magnétosomes. Néanmoins aucune différence n'a été constatée au niveau du nombre de magnétosomes par cellule quelles que soient les conditions malgré la présence de fer dans le gel. Afin d'analyser la production des magnétosomes au cours du temps, nous avons utilisé une autre technique : la mesure magnétique par VSM. Cette méthode permet notamment de déterminer l'aimantation de l'échantillon. Le suivi de la production des magnétosomes a été réalisé en prenant comme référence,

les cellules magnétiques encapsulées au bout d'1h et pour suivre l'évolution, les bactéries encapsulées au bout de 7 jours en présence ou en absence d'un champ magnétique. Les résultats ont montré que les bactéries encapsulées initialement avec des magnétosomes produisaient de nouvelles particules en présence de fer au bout de 7 jours (augmentation de l'aimantation à saturation). Les observations en microscopie ayant montré que le nombre moyen de magnétosomes par cellule n'augmentait pas, cela suggère que la faible fraction de bactéries non magnétiques (toujours présente dans une culture) pourrait produire des magnétosomes, ce qui augmenterait l'aimantation à saturation au bout de 7 jours. Toutefois, le champ magnétique ne semblait pas augmenter la production des magnétosomes au bout de 7 jours.

Toutes ces études réalisées sur des cellules non magnétiques et magnétiques pour le suivi de la production des magnétosomes et de l'influence du champ magnétique sur les processus de biominéralisation, nous ont donc permis de constater deux effets en présence d'un champ magnétique : une production anticipée des magnétosomes et un changement d'orientation des chaînes de magnétosomes.

Ces observations suscitent des questions au sujet des phénomènes physiques, voire chimiques s'exerçant sur les magnétosomes. Comment les chaînes de magnétosomes peuvent-elles s'orienter dans le sens des lignes de champ ? Des chaînes préexistantes peuvent-elles s'orienter ? Les magnétosomes en formation peuvent-ils directement s'aligner dans le sens des lignes du champ ? Par quel moyen les chaînes restent-elles fixées à la membrane plasmique malgré leur déplacement dans le champ ? Nous avons donc proposé plusieurs explications hypothétiques à ce sujet.

Effet hypothétique du champ magnétique sur l'orientation des chaînes des magnétosomes

Comme des études l'ont démontré, les magnétosomes sont intégrés à la membrane interne de la cellule (Komeili *et al.,* 2004 ; 2006). Par conséquent, l'application d'un champ magnétique extérieur peut entraîner un réalignement de la cellule entière. Cependant, si les magnétosomes étaient libres dans la cellule, cette configuration suggèrerait la présence d'une structure distincte qui permettrait la connexion entre la chaîne des magnétosomes et le corps de la cellule pour pouvoir orienter la bactérie dans le champ magnétique (Komeili *et al.,* 2012). Ce dernier point est particulièrement intéressant dans le cadre de notre étude car la rotation et la préservation des chaînes dans le sens des lignes du champ magnétique exigeraient soit un maintien de l'extrémité de la chaîne au moyen d'un ou plusieurs magnétosomes invaginés à la membrane cytoplasmique soit une intégration d'une structure connectant la chaîne entière à la membrane si les magnétosomes sont sous forme de vésicules détachées. Cependant, comme l'ont suggéré Komeili *et al.,* 2012, la connexion des magnétosomes par invagination à la membrane serait importante pour le transport du

fer et la précipitation de la magnétite mais malgré cette configuration très plausible, il existe tout de même des problèmes concernant la formation des magnétosomes. Un mélange du contenu entre les deux compartiments (magnétosome et espace périplasmique) pourrait altérer l'environnement chimique spécifique qui serait nécessaire pour la production de magnétite pure. De plus, chez certaines espèces de bactéries magnétotactiques comme *Magnetobacterium bavaricum* (Mbav), les études ont montré que les magnétosomes seraient détachés de la membrane cellulaire (Jogler *et al.,* 2011). Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les processus de biominéralisation sont distincts d'une espèce à une autre.

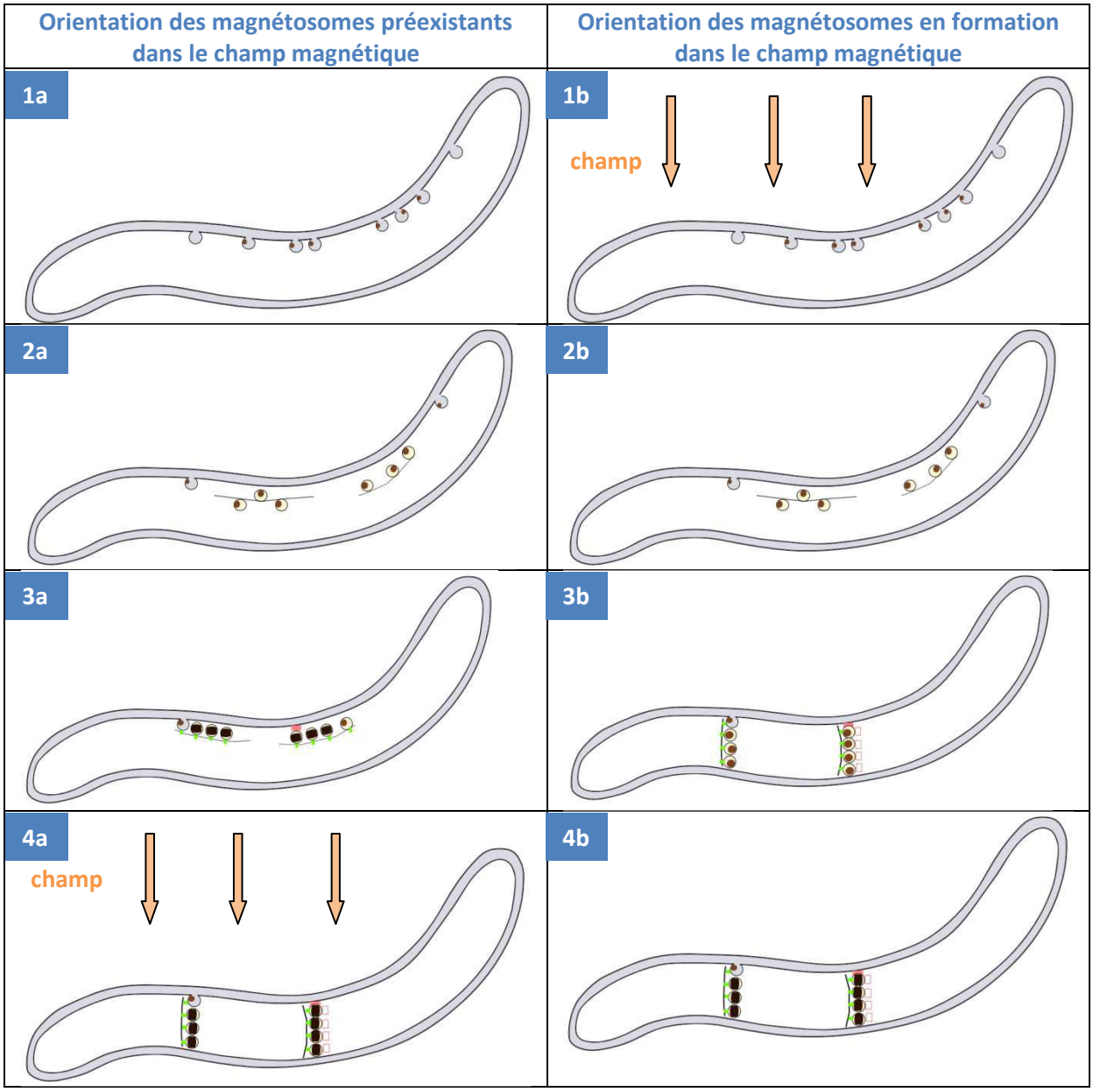
Au cours de nos expériences, nous avons pu constater que des chaînes de magnétosomes pouvaient s'aligner dans le sens des lignes du champ magnétique. L'arrangement des magnétosomes en chaînes suggère par ailleurs que ceux-ci seraient maintenus par un filament MamK pour stabiliser la chaîne (Komeili *et al.,* 2006 ; Scheffel *et al.,* 2006). Après avoir encapsulé des bactéries en absence de fer, nous avons pu observer des chaînes de magnétosomes déviées dans le sens du champ, ce qui pourrait donc suggérer que le déplacement des magnétosomes préexistants pourrait se réaliser. Toutefois, il est particulièrement surprenant de voir que ces chaînes peuvent être maintenues transversalement à la bactérie après avoir retiré le champ (que ce soit en présence ou en absence de fer). Ces observations suggèrent une bonne rigidité du filament qui pourrait être maintenu dans la position qu'il avait adopté en présence d'un champ mais également un maintien de la chaîne par un ou plusieurs magnétosomes invaginés à la membrane à l'extrémité de la chaîne. Toutefois, il existe également une autre hypothèse où la chaîne stabilisée par le filament MamK serait connectée à la membrane cytoplasmique au moyen d'une structure spécifique qui fixerait ainsi la chaîne après le déplacement. Cependant, les expériences réalisées en présence de fer, n'excluent pas l'idée que des magnétosomes en cours de formation soient collectés par le filament MamK qui les rassemblerait pour former une chaîne s'orientant directement dans le champ magnétique. Dans toutes les situations observées, l'orientation des magnétosomes dans le champ magnétique et donc leur déplacement nécessiterait que ceux-ci soient détachés de la membrane cytoplasmique. Il est particulièrement difficile d'imaginer un déplacement des invaginations le long de la membrane cytoplasmique. De plus, nous avons pu constater que certaines chaînes de magnétosomes au sein d'une même bactérie pouvaient s'orienter tandis que d'autres restaient alignées dans l'axe longitudinal. Ceci montre bien que des magnétosomes bien fixés à la membrane (soit par une invagination soit par la présence d'une autre structure fixatrice) ne peuvent pas s'orienter et que seules les vésicules des magnétosomes détachées de la membrane pourraient se déplacer.

Nous allons à présent proposer un modèle hypothétique sur l'arrangement des magnétosomes dans des conditions où la bactérie est piégée dans une matrice en présence d'un champ magnétique.

Ce modèle s'inspire des hypothèses suggérées dans la littérature et que nous avons sélectionné ci-dessous afin d'apporter une suite logique dans le cadre de notre étude :

- Les vésicules des magnétosomes prendraient naissance à de multiples sites (Komeili *et al.,* 2004)
- La biominéralisation de la magnétite se produirait par co-précipitation du fer (II) et (III) dans les magnétosomes invaginés (Faivre *et al.,* 2007)
- La croissance des cristaux de magnétite se déroulerait ensuite dans des vésicules séparées de la membrane cytoplasmique (Faivre *et al.,* 2007)
- Le filament mamK servirait de piste pour le positionnement des magnétosomes en chaîne. De courts réseaux filamenteux rassembleraient 4 à 5 magnétosomes et s'associeraient entre eux pour former un long filament (Komeili *et al.,* 2006). MamK transporterait les magnétosomes nouvellement formés avec des cristaux en croissance et les conduirait ainsi à la fin de la chaîne de magnétosomes préexistante (Frankel & Bazylinski, 2006).
- La protéine MamJ permettrait la connexion des vésicules des magnétosomes au filament MamK (Komeili *et al.,* 2006 ; Scheffel *et al.,* 2006 ; Scheffel & Schüler, 2007)
- Le filament MamK serait très dynamique et les processus de polymérisation et dépolymérisation pourraient générer des forces suffisantes pour le transport et la relocalisation des magnétosomes (Pradel *et al.,* 2006).
- **Après l'application d'un champ magnétique sur des cellules piégées, les courtes chaînes regroupant 4 à 5 magnétosomes stabilisés par un court filament, s'orienteraient dans le sens des lignes de champ et seraient fixées à la membrane soit par l'intermédiaire de magnétosomes invaginés en bout de chaîne soit par une autre structure afin d'éviter le déplacement des chaînes dans la cellule.**

Voici un modèle hypothétique que nous avons proposé sur l'effet du champ magnétique sur l'orientation des chaînes de magnétosomes préexistantes ou en formation :



Légende	
	Magnétite en formation
	Protéine MamJ
	Structure fixatrice
	Filament MamK
	Structure fixatrice en formation
	Magnétite mature

Mécanismes mis en jeu dans le modèle :

Etape 1a et 1b :

- Formation des magnétosomes par invagination de la membrane

- Co-précipitation du Fe (II) et (III)

Etape 2a et 2b :

- Croissance des cristaux dans des vésicules détachées de la membrane cytoplasmique
- Le filament MamK collecte les magnétosomes

Etape 3a :

- Formation des magnétosomes matures et alignement en chaîne grâce au filament MamK
- MamJ connecte les vésicules des magnétosomes au filament MamK
- Apparition d'une structure fixatrice des vésicules des magnétosomes à la membrane cytoplasmique

Etape 4a :

-En présence d'un champ, les chaînes se déplacent en bloc et sont maintenues soit par un magnétosome invaginé à l'extrémité soit par des structures fixatrices

Etape 3b :

- Alignement en chaîne des magnétosomes en cours de croissance grâce au filament MamK et connexion du filament aux vésicules des magnétosomes au moyen de MamJ
- Sous l'effet du champ (appliqué au cours de l'étape 1b), les chaînes se déplacent en bloc et sont maintenues soit par un magnétosome invaginé à l'extrémité soit par une structure fixatrice

Etape 4b :

- En présence d'un champ, les cristaux de magnétite mature s'orientent dans les lignes de champ et les chaînes de magnétosomes sont fixées à la membrane soit par l'intermédiaire d'un magnétosome invaginé à l'extrémité soit par plusieurs structures fixatrices

Discussion préliminaire de l'effet de l'addition de nanoparticules magnétiques

Dans la dernière partie du chapitre, nous avons présenté les travaux réalisés sur l'encapsulation des cellules non magnétiques et magnétiques dans des matrices de silice contenant des nanoparticules de magnétite de 32 nm et 45 nm. Cependant, les résultats ne sont pas vraiment probants et difficilement interprétables. En effet, les cellules magnétiques piégées dans ces matrices magnétiques ont été exposées pendant 15 min à un champ extérieur afin d'obtenir une rémanence au sein des particules de magnétite. Suite à cette exposition, même de courte durée, la présence de chaînes de magnétosomes distordues et voire même orientées perpendiculairement à la bactérie

pour certaines, peut difficilement être interprétée comme un effet du champ créé par les particules magnétiques synthétiques. Le champ magnétique extérieur aurait peut-être pu affecter légèrement les chaînes pendant les 15 min d'exposition. Suite à ces observations, il serait particulièrement très intéressant d'exposer des cellules magnétiques piégées dans une matrice non magnétique (juste de silice) et d'appliquer un champ de 15 min afin de voir si celui-ci peut affecter les chaînes sur cette courte durée. Ainsi, nous pourrions dissocier l'effet lié aux nanoparticules de magnétite de celui impacté par le champ magnétique extérieur.

Plusieurs expériences complémentaires par analyse en VSM pourraient être effectuées afin de suivre la production des magnétosomes pour les cellules encapsulées sans magnétosomes dans des gels de silice supplémentés en fer en présence et en absence d'un champ magnétique au bout d' 1h et 7 jours. En ce qui concerne les bactéries encapsulées avec des magnétosomes, il aurait été particulièrement très intéressant d'avoir un suivi au bout d'1, 2 et 4 jours afin de déterminer à quel moment les bactéries peuvent être affectées par un champ magnétique extérieur. Cette étude par microscopie électronique permettrait de déterminer à quel moment les chaînes s'orientent dans les lignes de champ.

D'un point vue biochimique, une quantification de l'ATP intracellulaire pourrait être corrélée à la production des magnétosomes qui est ATP dépendante. Une étude décrite dans la littérature a d'ailleurs été réalisée en ce sens sur des *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1) (Yang *et al.,* 2013).

Enfin l'observation des bactéries en microcopie optique permettrait de voir si la présence des chaînes perpendiculaires affecterait le déplacement des cellules en présence d'un champ magnétique extérieur.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ce travail consistait en l'élaboration de matrices magnétiques cytocompatibles pour l'étude des bactéries immobilisées. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels d'un champ magnétique interne et externe aux gels sur la viabilité des cellules encapsulées et sur les processus de biominéralisation. Un des aspects clés au coeur de ce sujet était d'évaluer l'impact d'un champ magnétique statique sur les processus de biominéralisation chez les bactéries magnétotactiques AMB-1.

Afin d'exposer les bactéries à un champ magnétique homogène, deux approches ont permis d'obtenir des matrices magnétiques aux propriétés différentes : par intégration de nanoparticules de magnétite et par exposition à un champ magnétique statique de 80 mT. Dans un premier temps, des matrices fonctionnelles à base de silice et de nanoparticules de magnétite ont été élaborées dans des conditions cytocompatibles pour la bioencapsulation. Des mesures magnétiques nous ont permis de voir que les propriétés magnétiques des gels pouvaient être modulées en fonction de la taille des nanoparticules de magnétite et de leur concentration. Afin d'évaluer la cytocompatibilité des matrices non magnétiques (à base de silice) et magnétiques (à base de silice et de nanoparticules de magnétite), des bactéries *E.coli* et *M. magneticum* ont été immobilisées dans les gels sur une période de 15 jours. Les études de viabilité ont ainsi montré que l'activité métabolique des cellules était préservée pour les deux types de gel. Les encapsulations dans des matériaux magnétiques ou non se sont donc révélées adaptées pour le maintien de la viabilité des bactéries sur le long terme. Au cours de cette étude, nous avons pu également montrer qu'un champ magnétique statique de 80 mT n'affectait pas la survie des cellules encapsulées dans les matrices de silice. Seul un effet a pu être constaté sur la production d'ATP chez les bactéries *E.coli* au bout d'un jour d'encapsulation. Toutefois malgré l'absence d'effets visibles sur la viabilité des bactéries, d'autres processus biochimiques pourraient intervenir sans affecter la survie des cellules suite à une adaptation au stress potentiellement lié à la présence d'un champ. D'autres études pourraient à l'avenir être conduites afin de déceler d'éventuels effets sur la production d'ERO, de protéines « Heat shock » et sur le transport du fer intracellulaire. Nous avons également pu mettre en évidence que le comportement des cellules encapsulées dépendait de leur état physiologique au moment de l'encapsulation mais également du type de cellule (avec ou sans magnétosomes dans le cas des bactéries AMB-1). D'après toutes ces études, nous avons pu voir que les gels de silice élaborés par "chimie douce" offraient un environnement protecteur pour les cellules. Après avoir pu démontrer que les matrices non magnétiques et magnétiques étaient cytocompatibles, que les bactéries préservaient leur activité

métabolique dans les gels et qu'un champ magnétique n'affectait pas la survie des cellules, les études sur les phénomènes de biominéralisation ont pu être réalisées dans de bonnes conditions.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets d'un champ magnétique statique sur les processus de biominéralisation. Plusieurs phénomènes ont pu être constatés sous l'influence d'un champ magnétique : une production des magnétosomes de manière anticipée et une orientation des chaînes de magnétosomes dans le sens des lignes du champ. En effet, nous avons pu constater que suite à une exposition au champ magnétique, le nombre de bactéries contenant des magnétosomes augmentait avant 4 jours tandis que cette fraction de cellules magnétiques était plus importante au bout de 4 jours en absence d'un champ magnétique. Ce phénomène pourrait être lié à une entrée du fer facilitée sous l'effet du champ en raison de son impact potentiel au niveau de la membrane cellulaire diamagnétique et des protéines membranaires. Des études ont d'ailleurs suggéré que les molécules de la membrane cellulaire pourraient entrer en mouvement sous l'effet d'un champ extérieur conduisant ainsi à un effet sur les canaux ioniques et sur la mobilité des ions à travers la membrane (Rosen A. D., 1993, 1994, 1996 ; Strasak *et al.,* 2002; Luciana & Luigi, 2005). Toutefois, un autre phénomène lié à l'interaction du champ sur les particules biogéniques a pu être observé. Des bactéries piégées dans des matrices de silice en présence d'un champ magnétique possédaient parfois des chaînes de magnétosomes orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal. Les mécanismes d'orientation des chaînes de magnétosomes dans les lignes de champ restent encore énigmatiques. En effet, comme les processus de biominéralisation en général ne sont pas encore totalement élucidés, il est particulièrement difficile de comprendre les mécanismes exacts se déroulant sur les bactéries piégées dans la silice en présence d'un champ. Dans ces conditions, l'environnement joue un rôle important et peut donc affecter les processus de biominéralisation qui sont très dépendants des conditions expérimentales (température, nutriments, oxygène, pH, concentrations en fer...). Nous avons toutefois apporté quelques explications hypothétiques sur les effets potentiels du champ magnétique sur le mouvement des chaînes de magnétosomes. L'orientation de courtes chaînes dans le champ suggère que les magnétosomes sont stabilisés par un filament et fixés à la membrane cytoplasmique après leur déplacement afin de maintenir leur orientation une fois que le champ magnétique est retiré. Les magnétosomes sous forme de vésicules détachées de la membrane et alignés en chaîne pourraient se déplacer et la chaîne serait fixée soit par des magnétosomes invaginés situés à l'extrémité, soit au moyen d'une autre structure. L'absence de chaînes agrégées montrerait que celles-ci sont fixées à la cellule.

Notre étude sur les processus de biominéralisation en présence d'un champ magnétique s'est révélée très intéressante dans le sens où elle s'ouvre sur de nouvelles perspectives encore non explorées sur les processus de biominéralisation. Il serait particulièrement intéressant de voir si les

chaînes perpendiculaires pourraient de nouveau se positionner suivant l'axe de la bactérie après l'application d'un autre champ. Des études par holographie électronique permettraient de déterminer comment les nanoparticules interagissent magnétiquement entre elles et si celles-ci forment un dipôle magnétique stable orienté perpendiculairement à la bactérie. Nous pourrions également déterminer à quelle distance les magnétosomes peuvent interagir magnétiquement et si les chaînes parallèles sont en interaction (ces expériences sont actuellement en cours).

Ce travail de thèse s'inscrit dans une thématique reliant diverses disciplines telles que la chimie, la physique et la biologie. Ce sujet très interdisciplinaire nous a permis d'explorer plusieurs aspects allant des mécanismes intracellulaires (ATP, biominéralisation) jusqu'à l'étude des propriétés magnétiques des biomatériaux élaborés par « chimie douce ». Cette étude suscite encore de nombreuses questions et pourrait à l'avenir permettre l'élaboration de bioréacteurs pour la production de nanoparticules biogéniques d'intérêt médical ou bien même pour l'élaboration de biomatériaux dépolluants. Au cours de notre étude, nous n'avons pas pu constater de modifications de la taille, de la morphologie des magnétosomes et de la longueur des chaînes sous l'application d'un champ magnétique statique. Toutefois, il serait très intéressant de voir les effets qu'exerceraient d'autres types de champ (pulsé ou alternatif) sur la formation des magnétosomes pour des bactéries encapsulées. Par cette approche d'élaboration de nanoparticules magnétiques par voie biocontrôlée, il serait possible d'augmenter ou d'améliorer la formation des magnétosomes sous l'application d'un champ magnétique. A travers l'ingénierie génétique en interaction avec un champ magnétique extérieur, il serait alors possible de construire des cristaux magnétiques fonctionnels pour diverses applications en biosciences et biotechnologie.

Références bibliographiques

Abreu, F., Cantão, M.E., Nicolás, M.F., Barcellos, F.G., Morillo, V., Almeida, L.G., Do Nascimento, F.F., Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., R de Vasconcelos, A.T., Lins, U., 2011. Common ancestry of iron oxide- and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. ISME J 5, 1634–1640.

Aldinucci, C., Garcia, J.B., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F., Rossi, C., Bonechi, C., Pessina, G.P., 2003. The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. *Bioelectromagnetics* 24, 373–379.

Alphandéry E., Amor M., Guyot F., Chebbi I., 2012. The effect of iron-chelating agents on *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1: stimulated growth and magnetosome production and improved magnetosome heating properties. *App. Microbiol. Biotechnol.* 96, 663–670.

Alphandéry, E., Faure, S., Seksek, O., Guyot, F., Chebbi, I., 2011. Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy. ACS Nano 5, 6279–6296.

Alvarez G. S., Foglia M. L., Camporotondi D. E., Tuttolomondo M. V., Desimone M. F., Diaz L. E., 2011. A functional material that combines the Cr(VI) reduction activity of Burkholderia sp. with the adsorbent capacity of sol–gel materials. *J. Mater. Chem*. 21, 6359.

Amara, S., Douki, T., Garel, C., Favier, A., Sakly, M., Rhouma, K.B., Abdelmelek, H., 2009. Effects of static magnetic field exposure on antioxidative enzymes activity and DNA in rat brain. *Gen. Physiol. Biophys.* 28, 260–265.

Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S.S., Tanaka, T., Matsunaga, T., 2007. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. Biomaterials 28, 5381–5389.

Ammar, S., Helfen, A., Jouini, N., Fiévet, F., Rosenman, I., Villain, F., Molinié, P., Danot, M., 2001. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferriteparticles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. *J. Mater. Chem.* 11, 186–192.

Ammar, S., Jouini, N., Fiévet, F., Beji, Z., Smiri, L., Moliné, P., Danot, M., Grenèche, J.-M., 2006. Magnetic properties of zinc ferrite nanoparticles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. *J. Phys.: Condens. Matter* 18, 9055.

Amoura, M., Brayner, R., Perullini, M., Sicard, C., Roux, C., Livage, J., Coradin, T., 2009. Bacteria encapsulation in a magnetic sol–gel matrix. *Journal of Materials Chemistry* 19, 1241.

Amoura, M., Nassif, N., Roux, C., Livage, J., Coradin, T., 2007. Sol–gel encapsulation of cells is not limited to silica: long-term viability of bacteria in alumina matrices. *Chemical Communications* (39), 4015-4017.

Amoura, M., Roux, C., Masse, S., Steunou, N., Coradin, T., 2010. Bacteria encapsulation in colloidal inorganic matrices: Is it a general method? *C. R. Chimie* 13, 52–57.

Arakaki, A., Masuda, F., Amemiya, Y., Tanaka, T., Matsunaga, T., 2010. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. J Colloid Interface Sci 343, 65–70.

Arakaki, A., Webb, J., Matsunaga, T., 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in Magnetospirillum magneticum strain AMB-1. J. Biol. Chem. 278, 8745–8750.

Arató, B., Szányi, Z., Flies, C., Schüler, D., Frankel, R.B., Buseck, P.R., Pósfai, M., 2005. Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. American Mineralogist 90, 1233–1240.

Ardelean, I.I., Moisescu, C., Popoviciu, D.R., 2008. Magnetotactic Bacteria and Their Potential for Terraformation, in: Seckbach, J., Walsh, M. (Eds.), From Fossils to Astrobiology, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Springer Netherlands, pp. 335–350.

Ault-Riché D., Fraley C. D., Tzeng C-M., Kornberg A., 1998. Novel Assay Reveals Multiple Pathways Regulating Stress-Induced Accumulations of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli. Journal of bacteriology* 180 (7), 1841-1847.

Baca, H.K., Ashley, C., Carnes, E., Lopez, D., Flemming, J., Dunphy, D., Singh, S., Chen, Z., Liu, N., Fan, H., López, G.P., Brozik, S.M., Werner-Washburne, M., Brinker, C.J., 2006. Cell-Directed Assembly of Lipid-Silica Nanostructures Providing Extended Cell Viability. *Science* 313, 337–341.

Bahaj, A.S., Croudace, I.W., James, P.A.B., 1994. Treatment of heavy metal contaminants using magnetotactic bacteria, in: IEEE Transactions on Magnetics. IEEE, pp. 4707–4709.

Bahaj, A.S., Croudace, I.W., James, P.A.B., Moeschler, F.D., Warwick, P.E., 1998a. Continuous radionuclide recovery from wastewater using magnetotactic bacteria. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 184, 241–244.

Bahaj, A.S., Ellwood, D.C., Watson, J.H.P., 1991. Extraction of heavy metals using microorganisms and high gradient

magnetic separation. IEEE Transactions on Magnetics 27, 5371–5374.

Bahaj, A.S., James, P.A.B., Moeschler, F.D., 1998b. Low magnetic-field separation system for metal-loaded magnetotactic bacteria. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 177-181, 1453–1454.

Balkwill, D.L., Maratea, D., Blakemore, R.P., 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. J Bacteriol 141, 1399–1408.

Barrett, E.P., Joyner, L.G., Halenda, P.P., 1951. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 373–380.

Basti, H., Ben Tahar, L., Smiri, L.S., Herbst, F., Vaulay, M.-J., Chau, F., Ammar, S., Benderbous, S., 2010. Catechol derivatives-coated Fe3O4 and gamma-Fe2O3 nanoparticles as potential MRI contrast agents. J Colloid Interface Sci 341, 248–254.

Baumgartner, J., Bertinetti, L., Widdrat, M., Hirt, A.M., Faivre, D., 2013 (a). Formation of Magnetite Nanoparticles at Low Temperature: From Superparamagnetic to Stable Single Domain Particles. PLoS ONE 8, e57070.

Baumgartner, J., Dey, A., Bomans, P.H.H., Le Coadou, C., Fratzl, P., Sommerdijk, N.A.J.M., Faivre, D., 2013 (b). Nucleation and growth of magnetite from solution. Nat Mater 12, 310–314.

Baumgartner, J., Morin, G., Menguy, N., Perez Gonzalez, T., Widdrat, M., Cosmidis, J., Faivre, D., 2013 (c). Magnetotactic bacteria form magnetite from a phosphate-rich ferric hydroxide via nanometric ferric (oxyhydr)oxide intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 14883–14888.

Bazylinski, D. A., Frankel, R. B., 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 217–230.

Bazylinski, D.A., Blakemore, R.P., 1983. Denitrification and Assimilatory Nitrate Reduction in Aquaspirillum magnetotacticum. Appl Environ Microbiol 46, 1118–1124.

Bazylinski, D.A., Dean, A.J., Schüler, D., Phillips, E.J., Lovley, D.R., 2000. N2-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, Geobacter and Magnetospirillum species. Environ. Microbiol. 2, 266–273.

Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., 2000. Biologically-Controlled Mineralization of Magnetic Iron Minerals by Magnetotactic Bacteria 109–144.

Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Mann, S., King, J.W., Donaghay, P.L., Hanson, A.K., 1995. Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe3O4) and Greigite (Fe3S4) in a Magnetotactic Bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3232–3239.

Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Jannasch, H.W., 1988. Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. Nature 334, 518–519.

Bazylinski, D.A., Garratt-Reed, A.J., Frankel, R.B., 1994. Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. Microsc. Res. Tech. 27, 389–401.

Bazylinski, D.A., Lefèvre, C.T., 2013. Magnetotactic Bacteria from Extreme Environments. Life 3, 295–307.

Bazylinski, D.A., Moskowitz, B.M., 1997. Microbial biomineralization of magnetic iron minerals; microbiology, magnetism and environmental significance. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 35, 181–223.

Bellini, S., 1963. Su di un particolare comportamento di batteri d'acqua dolce. *Instituto di Microbiologia dell'Universita di Pavia.*

Ben-Yoav H., Melamed S., Freeman A., Shacham-Diamand Y. Belkin S., 2011. Whole-cell biochips for bio-sensing: integration of live cells and inanimate surfaces. *Crit. Rev. Biotechnol*. 31, 337.

Bertani, L.E., Huang, J.S., Weir, B.A., Kirschvink, J.L., 1997. Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of Magnetospirillum magnetotacticum. Gene 201, 31–36.

Bigalke D.L., 1984. Methods used for monitoring the microbiological quality of raw milk. *Part I. Dairy Food Sanit.* 4 (5), 189–190.

Binhi, V.N., 1997a. The mechanism of magnetosensitive binding of ions by some proteins. *Biophysics* 42, 317–322.

Binhi, V.N., 1997b. Interference of ion quantum states within a protein explains weak magnetic field's effect on biosystems. *Electro and Magnetobiology* 16, 203–214.

Binhi, V.N., 1998. Interference mechanism for some biological effects of pulsed magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, 73–81.

Binhi, V.N., 2000. Amplitude and frequency dissociation spectra of ion protein complexes rotating in magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 34–45.

Binhi, V.N., Alipov, Y.D., Belyaev, I.Y., 2001. Effect of static magnetic field on E. coli cells and individual rotations of ion–protein complexes. *Bioelectromagnetics* 22, 79–86.

Black, M., Soo, L., Papstein, V., 1995. Effects of low frequency magnetic fields on Na,K-ATPase activity. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 38, 267–273.

Blakemore R. P., Maratea D., Wolfe R. S., 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacterial.* 140 (2), 720-729.

Blakemore, R. P., Frankel, R. B. & Kalmijn, A. J. 1980. South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere. *Nature* 286, 384–385.

Blakemore, R.P., 1975. Magnetotactic bacteria. Science 190, 377–379.

Blakemore, R.P., 1982. Magnetotactic Bacteria. Annual Review of Microbiology 36, 217–238.

Böttcher H., Soltmann U., Mertig M., Pompe W., 2004. Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development. *J. Mater. Chem*. 14, 2176.

Bragg, W.H., 1915. The structure of magnetite and the spinels. Nature 95-561.

Brasack I., Böttcher H. Hempel U., 2000. Biocompatibility of Modified Silica-Protein Composite Layers. J. *Sol-Gel Sci. Technol*. 19, 479.

Brayner, R., Barberousse, H., Hemadi, M., Djedjat, C., Yéprémian, C., Coradin, T., Livage, J., Fiévet, F., Couté, A., 2007. Cyanobacteria as Bioreactors for the Synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt Nanoparticles via an Enzyme-Mediated Route. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 7, 2696–2708.

Brayner, R., Dahoumane, S.A., Yéprémian, C., Djediat, C., Meyer, M., Couté, A., Fiévet, F., 2010. ZnO Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Ecotoxicological Studies. Langmuir 26, 6522–6528.

Brinker C. & Scherrer G., 1990. Sol-Gel Science : The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. *Academic, Boston*.

Brown, M. R. W., and Kornberg A., 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16085–16087.

Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309–319.

Bruylants, P., Munaut, A., Poncelet, G., Ladriere, J., Meyers, J., Fripiat, J., 1980. IR and Mössbauer study of iron glycerolates. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry 42, 1603–1611.

Butler, R.F., Banerjee, S.K., 1975. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. J. Geophys. Res. 80, 4049–4058.

Buxbaum, G., Printzen, H., 1993. Natural iron oxide pigments. In : Buxbaum, G. (ed) Industrial inorganic pigments. VCH, Weinheim, 85-96.

Cai, F., Li, J., Sun, J., Ji, Y., 2011. Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1. Chemical Engineering Journal 175, 70–75.

Calugay R. J., Miyashita H., Okamura Y., Matsunaga T., 2003. Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiology Letters* 218, 371-375.

Campostrini R., Carturan G., Caniato R., Piovan R., Filippini G., Innocenti G., Cappelletti E. M., 1996. Immobilization of Plant Cells in Hybrid Sol-Gel Materials. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 87–97.

Canfield, J. M., Belford, R. L., Debrunner, P. G. & Schulten, K. J. 1994. A perturbation theory treatment of oscillating magnetic fields in the radical pair mechanism. *Chem. Phys.* 182, 1–18.

Carturan G., Campostrini R., Dire S., Scardi V. De Alteriis E., 1989. Inorganic gels for immobilization of biocatalysts – inclusion of invertase – active whole cells of yeast (Saccharomyces cerevisae) into thin – layers of SiO2 gel deposited on glass sheets. *J. Mol. Catal*. 57, L13.

Carturan G., Toso R. B., Boninsegna S., Monte R. D., 2004. Encapsulation of Functional Cells by Sol-Gel Silica: Actual Progress and Perspectives for Cell Therapy. *J. Mater. Chem.* 14, 2087–2098.

Carturan, G., Monte, R.D., Pressi, G., Secondin, S., Verza, P., 1998. Production of Valuable Drugs from Plant Cells Immobilized by Hybrid Sol-Gel SiO2. Journal of Sol-Gel Science and Technology 13, 273–276.

Chapekar M. S., 2000. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 53, 617.

Chater, S., Abdelmelek, H., Douki, T., Garrel, C., Favier, A., Sakly, M., Ben Rhouma, K., 2006. Exposure to static magnetic field of pregnant rats induces hepatic GSH elevation but not oxidative DNA damage in liver and kidney. *Arch. Med. Res.* 37, 941–946.

Chen J., Xu Y., Xin J., Li S., Xia ., Cui J., 2004. Efficient immobilization of whole cells of Methylomonas sp. strain GYJ3 by sol–gel entrapment. *Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic*, 167–172.

Chen, H., Li, X., 2008. Effect of static magnetic field on synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by activated sludge. *Bioresource Technology* 99, 5538–5544.

Chen, J.-Y., Liao, Y.-L., Wang, T.-H., Lee, W.-C., 2006. Transformation of Escherichia coli mediated by magnetic nanoparticles in pulsed magnetic field. Enzyme and Microbial Technology, The Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC 2005) 39, 366–370.

Chia S., Urano J., Tamanoi F., Dunn B., Zink J. I., 2000. Patterned Hexagonal Arrays of Living Cells in Sol-Gel Silica Films. *J. Am. Chem. Soc. 122*, 6488–6489.

Chionna, A., Dwikat, M., Panzarini, E., Tenuzzo, B., Carla`, E.C., Verri, T., Pagliara, P., Abbro, L., Dini, L., 2003. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *European Journal of Histochemistry* 47, 299–308.

Chkoundali, S., Ammar, S., Jouini, N., Fiévet, F., Molinié, P., Danot, M., Villain, F., Grenèche, J.-M., 2004. Nickel ferrite nanoparticles: elaboration in polyol medium via hydrolysis, and magnetic properties. J. Phys.: Condens. Matter 16, 4357.

Chow, K., Tung, W.L., 2000. Magnetic field exposure enhances DNA repair through the induction of DnaK/J synthesis. *FEBS Lett.* 478, 133–136.

Coiffier A., Coradin T., Roux C.,. Bouvet O. M. M., Livage J., 2001. Sol – gel encapsulation of bacteria : a comparison between alkoxide and aqueous routes. *J. Mater. Chem*. 11, 2039-2044.

Colbert, A.P., Souder, J., Markov, M., 2009. Static magnetic field therapy: methodological challenges to conducting clinical trials. *Environmentalist* 29, 177–185.

Conroy J. F. T., Power M. E., Martin J., Earp B., Hosticka B., Daitch C. E., Norris, P. M., 2000. Cells in Sol_Gels I: A Cytocompatible Route for the Production of Macroporous Silica Gels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 18, 269–283.

Coradin T., Amoura M., Roux C., Livage J., 2009. Biocers, industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology : Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, *ed. M.C. Flickinger John Wiley & Sons*

Coradin, T., Nassif, N., Livage, J., 2003. Silica–alginate composites for microencapsulation. Appl Microbiol Biotechnol 61, 429–434.

Cornell R. M., Schwertmann U., 2003. The Iron Oxides : Structure, Properties, Reactions, Occurences and Uses. WILEY-VCH, ISBN : 3-527-30274-3.

Cox, B.L., Popa, R., Bazylinski, D.A., Lanoil, B., Douglas, S., Belz, A., Engler, D.L., Nealson, K.H., 2002. Organization and Elemental Analysis of P-, S-, and Fe-rich Inclusions in a Population of Freshwater Magnetococci. Geomicrobiology Journal 19, 387–406.

Crouch S. P., Koslowski R., Slater K. J., Fletcher J., 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immnol. Methods* 160, 81-88.

Dahoumane S. A., Djediat C., Yéprémian C., Couté A., Fiévet F., Coradin T., Brayner R., 2012. Recycling and Adaptation of Klebsormidium flaccidum Microalgae for the Sustained Production of Gold Nanoparticles. *Biotechnol. Bioengin*. 109, 284.

Dalbey R.E., Kuhn A., 2004. YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* 166 (6), 769-774.

Del Re, B., Bersani, F., Mesirca, P., Giorgi, G., 2006. Synthesis of DnaK and GroEL in Escherichia coli cells exposed to different magnetic field signals. *Bioelectrochemistry* 69, 99–103.

Delong, E.F., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 1993. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. Science 259, 803–806.

Deng, H., Li, X., Peng, Q., Wang, X., Chen, J., Li, Y., 2005. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. Angewandte Chemie International Edition 44, 2782–2785.

Depagne, C., Roux, C., Coradin, T., 2010. How to design cell-based biosensors using the sol–gel process. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 965–976.

Desimone M. F., Hélary C. , Mosser G. , Giraud-Guille M.-M., Livage J., Coradin T., 2010. Fibroblast encapsulation in hybrid silica–collagen hydrogels. *J. Mater. Chem*. 20, 666.

Devouard, B., Posfai, M., Hua, X., Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Buseck, P.R., 1998. Magnetite from magnetotactic bacteria; size distributions and twinning. American Mineralogist 83, 1387–1398.

Diaz-Ricci, J.C., Kirschvink, J.L., 1992. Magnetic domain state and coercivity predictions for biogenic greigite (Fe3S4): A comparison of theory with magnetosome observations. J. Geophys. Res. 97, 17309–17315.

Dickey, F.H., 1955. Specific Adsorption. *J. Phys. Chem.* 59, 695–707.

Diebel, C. E., Proksch, R., Green, C. R., Neilson, P. &Walker, M. M. 2000. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406, 299–302.

Docampo, R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P., Moreno S. N., 2005. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 251–261.

Dunin-Borkowski, R.E., McCartney, M.R., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Pósfai, M., Buseck, P.R., 1998. Magnetic Microstructure of Magnetotactic Bacteria by Electron Holography. Science 282, 1868–1870.

Edmonds, D.T., 1993. Larmor precession as a mechanism for the detection of static and alternating magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30, 3–12.

Eibl R., Kaiser S., Lombriser R. Eibl D., 2010. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl. Microb. Biotechnol.* 86.

Enzel P, Adelman N, Beckman KJ, Campbell DJ, Ellis AB, Lisensky GC., 1999. Preparation of an aqueous-based ferrofluid. *J. Chem. Educ.* 76, 943-948.

Faivre, D., Böttger, L.H., Matzanke, B.F., Schüler, D., 2007. Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds by a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and an iron(II) species. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 46, 8495–8499.

Faivre, D., Menguy, N., Posfai, M., Schüler, D., 2008. Environmental parameters affect the physical properties of fast-growing magnetosomes. American Mineralogist 93, 463–469.

Faivre, D., Schüler D., 2008. Magnetotactic bacteria and magnetosomes. Chemical reviews 108, 4875–98.

Fanelli, C., Coppola, S., Barone, R., Colussi, C., Gualaldi, G., Volpe, P., Ghibelli, L., 1999. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of CaCC influx. *FASEB Journal* 13, 95–102.

Faraji, M., Yamini, Y., Rezaee, M., 2010. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. J Iran Chem Soc 7, 1–37.

Farnum M., Zukoski C., 1999. Effect of Glycerol on the Interactions and Solubility of Bovine PancreaticTrypsin Inhibitor. *Biophysical Journal* 76, 2716–2726.

Fdez-Gubieda, M.L., Muela, A., Alonso, J., García-Prieto, A., Olivi, L., Fernández-Pacheco, R., Barandiarán, J.M., 2013. Magnetite biomineralization in Magnetospirillum gryphiswaldense: time-resolved magnetic and structural studies. ACS Nano 7, 3297–3305.

Ferrer M. L., Garcia-Carvajal Z.Y., Yuste L., Rojo F., del Monte F., 2006. Bacteria Viability in Sol−Gel Materials Revisited: Cryo-SEM as a Suitable Tool To Study the Structural Integrity of Encapsulated Bacteria. *Chemistry of Materials* 18 (6), 1458-1463.

Fievet, F., 2000. Polyol Process *in Fine Particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth*, vol. 92, *Surfactant Science Series*, T. Sugimoto, Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 460-496.

Fiévet, F., Brayner, R., 2013. The Polyol Process, in: Brayner, R., Fiévet, F., Coradin, T. (Eds.), Nanomaterials: A Danger or a Promise? Springer London, pp. 1–25.

Fievet, F., Lagier, J.P., Blin, B., Beaudoin, B., Figlarz, M., 1989. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. Solid State Ionics 32–33, Part 1, 198–205.

Filipic J., Kraigher B., Tepuš B., Kokol V., Mandic-Mulec I., 2012. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria Escherichia coli and Pseudomonas putida. *Bioresource Technology* 120, 225–232.

Finnie K. S., Bartlett J. R., Woolfrey J. L., 2000. Encapsulation of Sulfate-Reducing Bacteria in a Silica Host. *J. Mater. Chem.* 10, 1099–1101.

Fiorani, M., Cantoni, O., Sestili, P., Conti, R., Nicolini, P., Vetrano, F.,Dacha, M., 1992. Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Research* 282,25–29.

Fleissner, G., Holtkamp-Rotzler, E., Hanzlik, M., Winklhofer, M., Petersen, N. & Wiltschko, W. 2003. Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. *J. Comp. Neurol.* 458, 350–360.

Fleissner, G., Stahl, B., Thalau, P., Falkenberg, G. & Fleissner, G. 2007. A novel concept of Fe-mineral-based magnetoreception: histological and physicochemical data from the upper beak of homing pigeons. *Naturwissenschaften* 91, 632–641.

Fojt L., Strasak L., Vetterl V., Smarda J., 2004. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry* 63, 337– 341.

Frankel, R.B. & Blackmore R.P. 1989. Magnetite and magnetotaxis in microorganisms. *Bioelectromagnetics.*10: 223–237.

Frankel, R.B., 1984. Magnetic Guidance of Organisms. Annual Review of Biophysics and Bioengineering 13, 85–103.

Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2006. How magnetotactic bacteria make magnetosomes queue up. Trends in Microbiology 14, 329–331.

Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Johnson, M.S., Taylor, B.L., 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. Biophys J 73, 994–1000.

Frankel, R.B., Blakemore, R.P., Wolfe, R.S., 1979. Magnetite in Freshwater Magnetotactic Bacteria. Science 203, 1355–1356.

Frankel, R.B., Zhang, J.-P., Bazylinski, D.A., 1998. Single magnetic domains in magnetotactic bacteria. J. Geophys. Res. 103, 30601–30604.

Frey N.A., S. Sun, 2011. in: C. Altavilla, E. Ciliberto (Eds.), Inorganic Nanoparticles: Synthesis, Applications, and Perspectives, CRC Press, Boca Raton, FL, 33–68.

Fuls, P.F., Rodrique, L., Fipriat, J. J., 1970. Iron Alkoxide Obtained by Reacting Iron Oxides with Glycerol. Clays and Clay

Minerals 18, 53–62.

Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S., 2012a. Biotemplated Magnetic Nanoparticle Arrays. Small 8, 204–208.

Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S., 2012. Nanomagnetic Arrays Formed with the Biomineralization Protein Mms6. Journal of Nano Research 17, 127–146.

Gao, J., Gu, H., Xu, B., 2009. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. Accounts of Chemical Research 42, 1097–1107.

Gill I., Ballesteros A., 1998. Encapsulation of Biologicals within Silicate, Siloxane, and Hybrid Sol-Gel Polymers: An Efficient and Generic Approach. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8587–8598.

Gonzalez-Sandoval, M.P., Beesley, A.M., Miki-Yoshida, M., Fuentes-Cobas, L., Matutes-Aquino, J.A., 2004. Comparative study of the microstructural and magnetic properties of spinel ferrites obtained by co-precipitation. Journal of Alloys and Compounds, Proceedings of the VI Latin American Workshop on Magnetism, Magnetic Materials and their Applications 369, 190–194.

Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., Blakemore, R.P., 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. J Bacteriol 170, 834–841.

Gould J. L., Kirschvink J. L., Deffeyes K. S., 1978. Bees have magnetic remanence. *Science* 1026-1028.

Grünberg, K., Müller, E.-C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., Schüler, D., 2004. Biochemical and Proteomic Analysis of the Magnetosome Membrane in Magnetospirillum gryphiswaldense. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1040–1050.

Grunberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., Schuler, D., 2001. A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria. Appl Environ Microbiol 67, 4573–4582.

Guerin T.F., Mondido M., McClenn B., Peasley B., 2001. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant degrading microorganisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 340–345.

Guido, S., Tranquillo, R.T., 1993. A methodology for the systematic and quantitative study of cell contact guidance in oriented collagen gels. *J. Cell Sci.* 105, 317–331.

Gul Guven, R., Guven, K., Dawe, A., Worthington, J., Harvell, C., Popple, A., Smith, T., Smith, B., de Pomerai, D.I., 2006. Effects of radio-frequency fields on bacterial cell membranes and nematode temperature-sensitive mutants. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 788–795.

Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, UK.

Hamouda, A.A., Amiri, H.A.A., 2014. Factors Affecting Alkaline Sodium Silicate Gelation for In-Depth Reservoir Profile Modification. Energies 7, 568–590.

Harper, J.C., Khripin, C.Y., Khirpin, C.Y., Carnes, E.C., Ashley, C.E., Lopez, D.M., Savage, T., Jones, H.D.T., Davis, R.W., Nunez, D.E., Brinker, L.M., Kaehr, B., Brozik, S.M., Brinker, C.J., 2010. Cell-directed integration into three-dimensional lipid-silica nanostructured matrices. *ACS Nano* 4, 5539–5550.

Hartmann A., Braun V., 1981. Iron uptake and iron limited growth in *Escherichia coli* K12. *Arch. Microbiol*. 130, 353–356.

Hashish, A.H., El-Missiry, M.A., Abdelkader, H.I., Abou-Saleh, R.H., 2008. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 71, 895–902.

Heyen, U., Schüler, D., 2003. Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61, 536–544.

Heyers, D., Manns, M., Luksch, H., Gunturkun, O. & Mouritsen, H. 2007. A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *PLoS ONE* 2, e937.

Higashi, T., Yamagishi, A., Takeuchi, T., Date, M., 1995. Effects of static magnetic fields on erythrocyte rheology. *Bioelectrochem. Bioener.* 36, 101–108.

Higashi, T., Yamagishi, A., Takeuchi, T., Kawaguchi, N., Sagawa, S., Onishi, S., Date, M., 1993. Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field. *Blood* 82, 1328–1334.

Holland, R. A., Kirschvink, J. L., Doak, T. G. & Wikelski, M. 2008. Bats use magnetite to detect the Earth's magnetic field. *PLoS ONE* 3, e1676.

Holland, R.A., 2010. Differential effects of magnetic pulses on the orientation of naturally migrating birds. J R Soc Interface 7, 1617–1625.

Horiuchi, S., Ishizaki, Y., Okuno, K., Ano, T., Shoda, M., 2001. Drastic high magnetic field effect on suppression of Escherichia coli death. *Bioelectrochemistry* 53, 149–153.

Hudson A.J., Andrews S., Hawkins C., Williams J.M., Izuhara M., Meldrum F.C., Mann S., Harrison P.M., Guest J.R., 1993. Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *Eur. J. Biochem.* 218, 985–995.

Hughes, S., El Hai, A.J., Dobson, J., Martinac, B., 2005. The influence of static magnetic fields on mechanosensitive ion channel activity in artificial liposomes. *Eur. Biophys. J.* 34, 461–468.

Iler R. K., 1979. The Chemistry of Silica. *Wiley, New York.*

Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol. 57, 395–418.

Irwin, W. P. & Lohmann, K. J. 2005. Disruption of magnetic orientation in hatchling loggerhead sea turtles by pulsed magnetic fields. *J. Comp. Physiol.* A 191, 475–480.

Ishida A., Yoshikawa T., Nakazawa T., Kamidate T., 2002. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP. *Anal. Biochem.* 305, 236-241.

Iwasaka, M., Miyakoshi, J., Ueno, S., 2003. Magnetic field effects on assembly pattern of smooth muscle cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 39, 120–123.

Jackson M., Bowles J., Banerjee S., 2011. Interpretation of Low-Temperature Data Part V: The Magnetite Verwey Transition (Part B): Field Cooling Effects on Stoichiometric Magnetite Below TV. *The IRM Quaterly* 21 (4).

Jandacka, P., Alexa, P., Pistora, P., Li, J., Vojtkova, H., Hendrych, A., 2013. Size distributions of nanoparticles from magnetotactic bacteria as signatures of biologically controlled mineralization. American Mineralogist. 98, 2105-2114.

Ji, W., Huang, H., Deng, A., Pan, C., 2009. Effects of static magnetic fields on Escherichia coli. *Micron* 40, 894–898.

Jogler, C., Niebler, M., Lin, W., Kube, M., Wanner, G., Kolinko, S., Stief, P., Beck, A.J., De Beer, D., Petersen, N., Pan, Y., Amann, R., Reinhardt, R., Schüler, D., 2010. Cultivation-independent characterization of "Candidatus Magnetobacterium bavaricum" via ultrastructural, geochemical, ecological and metagenomic methods. Environmental Microbiology 12, 2466–2478.

Jogler, C., Schüler, D., 2007. Genetic Analysis of Magnetosome Biomineralization, in: Schüler, D. (Ed.), Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, pp. 133–161.

Jogler, C., Wanner, G., Kolinko, S., Niebler, M., Amann, R., Petersen, N., Kube, M., Reinhardt, R., Schuler, D., 2011. Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching Nitrospira phylum. Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 1134–1139.

Johnson P., Whateley L., 1971. On the use of polymerizing silica gel systems for the immobilization of trypsin. *Journal of Colloid and Interface Science* 37 (3), 557-563.

Jolivet, J.-P., 2000. Metal Oxide Chemistry and Synthesis. *Chichester : Wiley*.

Jolivet, J.-P., Livage, J., Henry, M., 1994. De la solution a l'oxide. *InterEditions.*

Jones I., Currie L., Martin R., 2002. A guide to biological skin substitutes. *Br. J. Plast. Surg.* 55, (3) 185-193.

Jorgensen C. K., 1963. Inorganic Complexes. *Academic Press, London.*

Jurinak, J.J., Summers, L.E., 1991. Laboratory Testing of Colloidal Silica Gel for Oilfield Applications. *J. SPE Prod. Eng. 6*, 406–412.

Kalmijn, A. J. & Blakemore, R. P. 1978. The magnetic behavior of mud bacteria. In Animal migration, navigation and homing (eds K. Schmidt-Koenig & W. T. Keeton). Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Kangas L., Gronroos M., Nieminen AL., 1984. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *MedBiol.* 62, 338–43.

Katzmann, E., Müller, F.D., Lang, C., Messerer, M., Winklhofer, M., Plitzko, J.M., Schüler, D., 2011. Magnetosome chains are recruited to cellular division sites and split by asymmetric septation. Molecular Microbiology 82, 1316–1329.

Katzmann, E., Scheffel, A., Gruska, M., Plitzko, J.M., Schüler, D., 2010. Loss of the actin-like protein MamK has pleiotropic effects on magnetosome formation and chain assembly in Magnetospirillum gryphiswaldense. Molecular Microbiology 77, 208–224.

Keim, C.N., Lins, U., Farina, M., 2009. Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 292, 250–253.

Kepert D. L., 1972. The Early Transition Metals. *Academic Press, London.*

Kessler V. G., Seisenbaeva G. A., Unell M., Akansson S. H**.**, 2008. Chemically Triggered Biodelivery Using Metal–Organic Sol–Gel Synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* 47, 8506.

Kirschvink J.L., 1981. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. *Journal of Experimental Biology* 92, 333–335.

Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J., 1992. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 7683.

Kirschvink, J. L. & Gould, J. L. 1981. Biogenetic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Biosystems* 13, 181–201.

Kirschvink, J. L., Walker, M. M. & Diebel, C. E. 2001. Magnetite based magnetoreception. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 462–467.

Kirschvink, J. L., Winklhofer, M. & Walker, M. M. 2010. Biophysics of magnetic orientation: strengthening the interface between theory and experimental design. *J. R. Soc. Interface* 7, S179–S191.

Klaus-Joerger T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C.G., 2001. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *TRENDS in Biotechnology* 19, (1).

Klumpp, S., Faivre, D., 2012. Interplay of Magnetic Interactions and Active Movements in the Formation of Magnetosome Chains. PLoS ONE 7

Knoblich, B., Gerber, T., 2001. Aggregation in SiO2 sols from sodium silicate solutions. *Journal of Non-Crystalline Solids* 283, 109–113.

Kobayashi, A., Kirschvink, J.L., Nash, C.Z., Kopp, R.E., Sauer, D.A., Bertani, L.E., Voorhout, W.F., Taguchi, T., 2006. Experimental observation of magnetosome chain collapse in magnetotactic bacteria: Sedimentological, paleomagnetic, and evolutionary implications. Earth and Planetary Science Letters 245, 538–550.

Kohno, M., Yamazaki, M., Kimura, I., Wada, M., 2000. Effect of static magnetic fields on bacteria: Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. *Pathophysiology* 7, 143–148.

Komeili, A., 2007. Molecular Mechanisms of Magnetosome Formation. Annual Review of Biochemistry 76, 351–366.

Komeili, A., 2012. Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 36, 232–255.

Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., Jensen, G.J., 2006. Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK. Science 311, 242–245.

Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T.J., Newman, D.K., 2004. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. PNAS 101, 3839–3844.

Kornberg A., 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable.

Körnig, A., Winklhofer, M., Baumgartner, J., Gonzalez, T.P., Fratzl, P., Faivre, D., 2014. Magnetite Crystal Orientation in Magnetosome Chains. Adv. Funct. Mater. 24, 3926–3932.

Kotani, H., Iwasaka, M., Ueno, S., 2000. Magnetic orientation of collagen and bone mixture. *J. Appl. Phys.* 87, 6191–6193.

Kula, B., Sobczak, A., Kuśka, R., 2000. EFFECTS OF STATIC AND ELF MAGNETIC FIELDS ON FREE-RADICAL PROCESSES IN RAT LIVER AND KIDNEY. *Electromagn Biol Med* 19, 99–105.

Kulaev I., Vagabov V., Kulakovskaya T., 1999. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 111–129.

Kumar A., Bisht B. S., Joshi V. D., Dhewa T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *Int J Environ Sci*. 1, 1079.

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 108, 2064–2110.

Leadbeater BSC., Riding R., 1986. Biomineralization in Lower Plants and Animals. *The Systematics Association Special Volume*. Clarendon Press, Oxford

Lednev, V.V., 1991. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12, 71–75.

Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., 2013. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 497–526.

Li J., Pan Y., Liu Q.S., Quin H.F., Deng C.L., Che R.C., Yang X.A., 2009 (b). A comparative study of magnetic properties between whole cells and isolated magnetosomes of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Chinese Science Bulletin*

Li J., Pan Y., Chen G., Liu Q., Tian L., Lin W., 2009 (a). Magnetite magnetosome and fragmental chain formation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1: transmission electron microscopy and magnetic observations. *Geophys. J. Int.* 177, 33–42.

Li, J., Pan, Y., 2012. Environmental Factors Affect Magnetite Magnetosome Synthesis in Magnetospirillum magneticum AMB-1: Implications for Biologically Controlled Mineralization. Geomicrobiology Journal 29, 362–373.

Li, Y.-G., Gao, H.-S., Li, W.-L., Xing, J.-M., Liu, H.-Z., 2009. In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria. Bioresour. Technol. 100, 5092–5096.

Liedvogel, M., Maeda, K., Henbest, K., Schleicher, E., Simon, T., Timmel, C.R., Hore, P.J., Mouritsen, H., 2007. Chemical Magnetoreception: Bird Cryptochrome 1a Is Excited by Blue Light and Forms Long-Lived Radical-Pairs. *PLoS ONE* 2, e1106.

Lin, W., Pan, Y., 2010. Temporal variation of magnetotactic bacterial communities in two freshwater sediment microcosms.

FEMS Microbiol. Lett. 302, 85–92.

Livage J., Henry M., Sanchez C., 1988. Sol-Gel Chemistry of Transition Metal Oxides. *Progress in Solid State Chemistry* 18, 259-342.

Lowenstam H. A., 1962. Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Geol. Soc. Am. Bull.* 73, 435-438.

Lu, Z., Yin, Y., 2012. Colloidal nanoparticle clusters: functional materials by design. Chem. Soc. Rev. 41, 6874–6887.

Luciana, D., Luigi, A., 2005. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 36, 195–217.

Lyle, D.B., Fuchs, T.A., Casamento, J.P., Davis, C.C., Swicord, M.L., 1997. Intracellular calcium signaling by Jurkat T-lymphocytes exposed to 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 18, 439–445.

Mandernack, K.W., Bazylinski, D.A., Shanks, W.C., Bullen, T.D., 1999. Oxygen and iron isotope studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria. *Science* 285, 1892–1896.

Mann S., Frankel R. B., Blakemore R. P. 1984. Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite. *Nature* 310, 405–407.

Mann S., Sparks N. H. C., Frankel R. B., Bazylinski D. A., Jannasch H. W., 1990. Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe3S4) and iron pyrite (FeS2) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.

Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mendoza, D., 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. J. Bacteriol. 186, 6681–6688.

Maratea, D. and Blakemore, R. P., 1981. *Aquaspirillum magnetotacticum* sp. nov., a magnetic spirillum. *Int. J. Syst. Bacterial.* 31, 452-455.

Marhold, S., Burda, H., Kreilos, I. &Wiltschko,W. 1997. Magnetic orientation in common molerats from Zambia. In Royal Institute of Navigation: birds, humans and other animals, paper no. 5.

Matsunaga T., Sakaguchi T., Tadokoro F., 1991. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 651–655.

Matsunaga T., Sakagushi T., 2000. Molecular Mechanism of Magnet Formation in Bacteria. *J. of Bioscience and Bioengineering* 90 (1), 1-13.

Matsunaga, T., 1997. Genetic analysis of magnetic bacteria, in: Materials science & engineering. C, Biomimetic materials, sensors and systems. Presented at the Bionic Design, Elsevier Sequoia, pp. 287–289.

Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y., Takeyama, H., 2005. Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium Magnetospirillum sp. strain AMB-1. DNA Res. 12, 157–166.

Matzanke B.F., Müller G..I, Bill E., Trautwein A.X., 1989. Iron metabolism of *Escherichia coli* studied by Mössbauer spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 183, 371–379.

McNicholl B. P., McGrath J.W., Quinn J. P., 2007. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Research* 41, 127 – 133.

Mendelovici, E., Sagarzazu, A., Villalba, R., 1986. High temperature synthesis and characteristics of Al-substituted iron alkoxide. Thermochimica Acta 107, 75–82.

Mi, W.B., Jiang, E.Y., Bai, H.L., 2009. Fe^{3+}/Fe^{2+} ratio controlled magnetic and electrical transport properties of polycrystalline $Fe_{3(1-\delta)}O_4$ films. J. Phys. D: Appl. Phys. 42, 105007.

Mihoub, M., El May, A., Aloui, A., Chatti, A., Landoulsi, A., 2012. Effects of static magnetic fields on growth and membrane lipid composition of Salmonella typhimurium wild-type and dam mutant strains. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 259–266.

Miller M. B., Bassler B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55 (1), 165-199.

Moisescu C., Bonneville S., Staniland S., Ardelean I., Benning L.G., 2011. Iron uptake kinetics and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* as a function of pH, temperature and dissolved iron availability. *Geomicrobiol.J.* 28, 590 600.

Moskowitz, B. M., 1991, Hitchhiker's Guide to Magnetism, Environmental Magnetism Workshop, pp. 1–38, Minneapolis, The Institute for Rock Magnetism and the Global Paleorecords Research Training Group.

Mouritsen, H., Feenders, G., Liedvogel, M., Wada, K., Jarvis, E.D., 2005. Night-vision brain area in migratory songbirds. PNAS 102, 8339–8344.

Muheim, R., Bäckman, J., Akesson, S., 2002. Magnetic compass orientation in European robins is dependent on both wavelength and intensity of light. J. Exp. Biol. 205, 3845–3856.

Munoz-Aguado, M. J., Gregorkiewitz, M., 1997. Sol-Gel Synthesis of Microporous Amorphous Silica from Purely Inorganic Precursors. *J. Colloid Interface Sci.* 185, 459–465.

Muralidhar R.V., Jayachandran G., Singh P., 2001. Development of high-density cultivation systems by bioencapsulation. *Current Science* 81 (3), 263-269.

Murat, D., Quinlan, A., Vali, H., Komeili, A., 2010. Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 5593–5598.

Murayama, M., 1965. Orentation of sickled erythrocytes in a magnetic field. *Nature* 206, 420–422.

Murua A., Portero A., Orive G., Hernandez R. M., de Castro M., Pedraz J. L., 2008. Cell Microencapsulation Technology: Towards Clinical Application. *J. Controlled Release* 132, 76–83.

Nakahara, T., Yaguchi, H., Yoshida, M., Miyakoshi, J., 2002. Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology* 224, 817–822.

Nakamura, C., Burgess, J.G., Sode, K., Matsunaga, T., 1995. An iron-regulated gene, magA, encoding an iron transport protein of Magnetospirillum sp. strain AMB-1. J. Biol. Chem. 270, 28392–28396.

Nakazawa, H., Arakaki, A., Narita-Yamada, S., Yashiro, I., Jinno, K., Aoki, N., Tsuruyama, A., Okamura, Y., Tanikawa, S., Fujita, N., Takeyama, H., Matsunaga, T., 2009. Whole genome sequence of Desulfovibrio magneticus strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria. Genome Res 19, 1801–1808.

Naresh, M., Das, S., Mishra, P., Mittal, A., 2012. The chemical formula of a magnetotactic bacterium. Biotechnol. Bioeng. 109, 1205–1216.

Nassif, N., Bouvet, O., Noelle Rager, M., Roux, C., Coradin, T., Livage, J., 2002. Living bacteria in silica gels. *Nat. Mater.* 1, 42–44.

Nassif, N., Livage, J., 2011. From diatoms to silica-based biohybrids. *Chem. Soc. Rev.* 40, 849–859.

Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Bouvet, O.M.M., Livage, J., 2004. Bacteria quorum sensing in silica matrices. *J. Mater. Chem*. 14, 2264–2268.

Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M.-N., Bouvet, O.M.M., Livage, J., 2003. A sol–gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry* 13, 203–208.

Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051–3064.

Neilands, J.B., 1991. A brief history of iron metabolism. Biol Metals 4, 1–6.

Neilands, J.B., 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J. Biol. Chem. 270, 26723–26726.

Nishikawa, S., 1915. The structure of some crystals of the spinel group. *Proc. Math. Phys. Soc.* Tokyo 8, 199-209.

Nociari MM., Shalev A., Benias P., Russo C., 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* 213, 157–167.

Noguchi, Y., Fujiwara, T., Yoshimatsu, K., Fukumori, Y., 1999. Iron reductase for magnetite synthesis in the magnetotactic bacterium Magnetospirillum magnetotacticum. Journal of bacteriology 181, 2142–2147.

Novák, J., Strasák, L., Fojt, L., Slaninová, I., Vetterl, V., 2007. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast Saccharomyces cerevisiae. *Bioelectrochemistry* 70, 115–121.

O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426.

Okano, H., 2008. Effects of static magnetic fields in biology: role of free radicals. *Front. Biosci.* 13, 6106–6125.

Okuda, Y., Denda, K. and Fukumori, Y. 1996, Cloning and sequencing of a gene encoding a new member of the tetratricopeptide protein family from magnétosomes of Magnetospirillum magnetotacticum. Gene 171, 99–102.

Okuda, Y., Fukumori, Y., 2001. Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing MAM22, in Escherichia coli. FEBS Letters 491, 169–173.

Oliver D. J., 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. The Journal of Microbiology 43 (s), 93-100.

Ouay, B.L., Coradin, T., Laberty-Robert, C., 2013. Silica–carbon hydrogels as cytocompatible bioelectrodes. *J. Mater. Chem.* B 1, 606–609.

Özdemir, Ö., Dunlop, D.J., Moskowitz, B.M., 1993. The effect of oxidation on the Verwey transition in magnetite. Geophys. Res. Lett. 20, 1671–1674.

Pacini, S., Gulisano, M., Peruzzi, B., Sgambati, E., Gheri, G., Bryk, S.G., Vannucchi, S., Polli, G., Ruggiero, M., 2003. Effects of 0.2T static magnetic field on human skin fibroblasts. *Cancer Detect.* Prev. 27, 327–332.

Page A.B., Page A.M., Noel C., 1993. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int. J. Oncol. 3*, 473–476.

Pan, W., Chen, C., Wang, X., Ma, Q., Jiang, W., Lv, J., Wu, L.-F., Song, T., 2010. Effects of pulsed magnetic field on the formation of magnetosomes in the Magnetospirillum sp. strain AMB-1. Bioelectromagnetics 31, 246–251.

Pannier, A., Oehm, C., Fischer, A.R., Werner, P., Soltmann, U., Böttcher, H., 2010. Biodegradation of fuel oxygenates by sol–gel immobilized bacteria Aquincola tertiaricarbonis L108. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 291–296.

Park, M., Park, S., Hyun, J., 2012. Use of magnetic nanoparticles to manipulate the metabolic environment of bacteria for controlled biopolymer synthesis. ACS Appl Mater Interfaces 4, 5114–5117.

Peña-Vázquez, E., Maneiro, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., Costas, E., 2009. Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosens Bioelectron* 24, 3538–3543.

Perullini, M., Amoura, M., Roux, C., Coradin, T., Livage, J., Japas, M.L., Jobbágy, M., Bilmes, S.A., 2011. Improving silica

matrices for encapsulation of Escherichia coli using osmoprotectors. *J. Mater. Chem.* 21, 4546–4552.

Popa, R., Fang, W., Nealson, K.H., Souza-Egipsy, V., Berquó, T.S., Benerjee, S.K., Penn, L.R., 2009. Effect of oxidative stress on the growth of magnetic particles in Magnetospirillum magneticum. Int. Microbiol. 12, 49–57.

Pope, E.J.A., Braun, K., Peterson, C.M., 1997. Bioartificial Organs I: Silica Gel Encapsulated Pancreatic Islets for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 8, 635–639.

Potenza, L., Ubaldi, L., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiarini, L., Dachà, M., 2004. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in Escherichia coli. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 561, 53–62.

Poul L., Ammar S., Jouini N., Fiévet F., Vilain F., 2003. Synthesis of Inorganic Compounds (Metal, Oxide and Hydroxide) in Polyol Medium: A Versatile Route Related to the Sol-Gel Process. *Journal of Sol-Gel Science and Tehnology* 26, 261–265.

Poul, L., Amar, S., Jouini, N., Fiévet, F., Villain, F., 2002. *J. Sol-Gel Sci Tech.*

Poul, L., Jouini, N., Fiévet, F., 2000. *Chemistry of Materials* 12, 3123.

Poul, L., Jouini, N., Fiévet, F., Herson, P., 1998. *Z. Kristallogr.* 213, 416.

Pradel, N., Santini, C.-L., Bernadac, A., Fukumori, Y., Wu, L.-F., 2006. Biogenesis of actin-like bacterial cytoskeletal filaments destined for positioning prokaryotic magnetic organelles. PNAS 103, 17485–17489.

Premkumar, J.R., Lev, O., Rosen, R., Belkin, S., 2001. Encapsulation of Luminous Recombinant E. coli in Sol–Gel Silicate Films. *Adv. Mater.* 13, 1773–1775.

Priev A., Almagor A., Yedgar S., Gavish B., 1996. Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. *Biochemistry* 35, 2061–2066.

Prozorov, T., Bazylinski, D.A., Mallapragada, S.K., Prozorov, R., 2013. Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 74, 133–172.

Prozorov, T., Mallapragada, S.K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T.J., Bazylinski, D.A., Prozorov, R., Canfield, P.C., 2007. Protein-Mediated Synthesis of Uniform Superparamagnetic Magnetite Nanocrystals. Adv. Funct. Mater. 17, 951–957.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., Bretscher, A., 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 559–591.

Quinlan, A., Murat, D., Vali, H., Komeili, A., 2011. The HtrA/DegP family protease MamE is a bifunctional protein with roles in magnetosome protein localization and magnetite biomineralization. Molecular Microbiology 80, 1075–1087.

Radoslovich, E. W., Raupachi, M., Slade, P. G., Taylor, R. M., 1970. Cristalline cobalt, zinc, manganese and iron alkoxides of glycerol. *Australian Journal of Chemistry* 23, 1963-1971.

Rafal E. Dunin-Borkowski, M.R.M., 2001. Off-axis electron holography of magnetotactic bacteria: magnetic microstructure of strains MV1 and MS1. European Journal of Mineralogy - EUROPEAN J MINERAL 13, 671–684.

Ramachandran S., Coradin T., Jain P. K., Verma S. K., 2009. Nostoc calcicola Immobilized in Silica-coated Calcium Alginate and Silica Gel for Applications in Heavy Metal Biosorption. *Silicon*, 1, 215.

Rao, N. N., and Torriani A., 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4, 1083–1090.

Rashid M. H., Rao N. N., Kornberg A., 2000 (a). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182, 225–227.

Rashid, M. H., and Kornberg A., 2000 (b). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4885–4890.

Rashid, M. H., Rumbaugh K., Passador L., Davies D. G., Hamood A. N., Iglewski B. H., Kornberg A., 2000 (c). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9636–9641

Rasmussen E.S., 1999. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro Mol. Toxicol.* 12, 47–58.

Reichard, P.U., Kretzschmar, R., Kraemer, S.M., 2007. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. Geochimica et Cosmochimica Acta, Physical Chemistry of Soils and Aquifers: A Special Issue in Honor of Garrison Sposito 71, 5635–5650.

Ritz, T., Adem, S. & Schulten, K. 2000. A model for vision based magnetoreception in birds. *Biophys. J.* 78, 707–718.

Ritz, T., Thalau, P., Phillips, J. B., Wiltschko, R. & Wiltschko, W. 2004. Resonance effects indicate radical pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature* 429, 177–180.

Ritz, T., Wiltschko, R., Hore, P. J., Rodgers, C. T., Stapput, K., Thalau, P., Timmel, C. R. & Wiltschko, W. 2009. Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys. J.* 96, 3451–3457.

Rodgers, F.G., Blakemore, R.P., Blakemore, N.A., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Maratea, D., Rodgers, C., 1990. Intercellular

structure in a many-celled magnetotactic prokaryote. Arch. Microbiol. 154, 18–22.

Rodrique L., Delvaux G., Dardenne A., 1978. Synthèse à haute température d'un glycérolate de fer au départ d'oxalate ferreux et ferrique. *Powder Technology* 19 (1), 93.

Rogers, C. T. & Hore, P. J. 2009. Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 353–360.

Rollinson C. L., 1956. The Chemistry of the Coordination Compounds. *ed. J. C. Bailar Reinhold, New York*, 448.

Rosen, A.D., 1993. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes* 1148, 317–320.

Rosen, A.D., 1994. Threshold and limits of magnetic field action at the presynaptic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes* 1193, 62–66.

Rosen, A.D., 1996. Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes* 1282, 149–155.

Rosen, A.D., 2003. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na+ channels in GH3 cells. *Bioelectromagnetics* 24, 517–523.

Rothschild L. J. and Mancinelli R. L., 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409.

Ruiz-Gómez, M.J., Prieto-Barcia, M.I., Ristori-Bogajo, E., Martínez-Morillo, M., 2004. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of Saccharomyces cerevisiae. Bioelectrochemistry 64, 151–155.

Sakaguchi, T., Arakaki, A., Matsunaga, T., 2002. Desulfovibrio magneticus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 215–221.

Sato, K., Yamaguchi, H., Miyamoto, H., Kinouchi, Y., 1992. Growth of human cultured cells exposed to a non-homogeneous static magnetic field generated by Sm-Co magnets. *Biochim. Biophys. Acta* 1136, 231–238.

Scaiano, J.C., Mohtat, N., Cozens, F.L., Mc Lean, J., Thansandote, A. 1994. Application of the radical pair mechanism to free radicals in organized systems : can the effects of 60 Hz be predicted from studies under static fields ? *Bioelectromagnetics* 15: 549–554.

Schabes M.E., 1991. Micromagnetic theory of nonuniform magnetization processis in magnetic recording particles. *J. Magn. Mater.* 95 (3), 249-288.

Scheffel, A., Gardes, A., Grunberg, K., Wanner, G., Schuler, D., 2008. The Major Magnetosome Proteins MamGFDC Are Not Essential for Magnetite Biomineralization in Magnetospirillum gryphiswaldense but Regulate the Size of Magnetosome Crystals. J Bacteriol 190, 377–386.

Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Plitzko, J.M., Schüler, D., 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* 440, 110–114.

Scheffel, A., Schüler, D., 2007. The Acidic Repetitive Domain of the Magnetospirillum gryphiswaldense MamJ Protein Displays Hypervariability but Is Not Required for Magnetosome Chain Assembly. *J. Bacteriol.* 189, 6437–6446.

Schleifer K. H., Schüler D., Spring S., Weizenegger M., Amann R., Ludwig W., Köhler M., 1991. The genus Magnetospirillum gen. nov. description of Magnetospirillum gryphiswaldense sp. nov. and transfer of Aquaspirillum magnetotacticum to Magnetospirillum magnetotacticum comb. nov. Syst. *Appl. Microbiol.* 14, 379–385.

Schliwa, M., Woehlke, G., 2003. Molecular motors. Nature 422, 759–765.

Schubbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., Schuler, D., 2003. Characterization of a Spontaneous Nonmagnetic Mutant of Magnetospirillum gryphiswaldense Reveals a Large Deletion Comprising a Putative Magnetosome Island. J Bacteriol 185, 5779–5790.

Schübbe, S., Williams, T.J., Xie, G., Kiss, H.E., Brettin, T.S., Martinez, D., Ross, C.A., Schüler, D., Cox, B.L., Nealson, K.H., Bazylinski, D.A., 2009. Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. Appl. Environ. Microbiol. 75, 4835–4852.

Schüler D., Baeuerlein E., 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense. Arch. Microbiol.* 166, 301–307.

Schüler D., Baeuerlein E., 1997. Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense. J Physiq IV* 7(C1), 647-650.

Schüler D., Baeuerlein E., 1998. Dynamics of iron uptake and Fe3O4 biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense. J. Bacteriol.* 180, 159-162.

Schüler D., Frankel RB., 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microb. Biotech.* 52, 464-47.

Schüler, D., Uhl, R., Bäuerlein, E., 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in Magnetospirillum gryphiswaldense. FEMS Microbiology Letters 132, 139–145.

Schulten, K. &Windemuth, A. 1986. Model for a physiological magnetic compass. In Biophysical effects of steady magnetic fields, vol. 11 (eds G. Maret, N. Boccara & J. Kiepenheuer), pp. 99–106. Berlin, Germany: Springer.

Schulten, K., Swenberg, C. E. &Weller, A. 1978. A biomagnetic sensory mechanism based on magnetic field modulated coherent electron spin motion. *Z. Phys. Chem.NF* 111, 1–5.

Seufferheld M. J., Alvarez H. M., Farias M. E., 2008. Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 5867–5874.

Shan, G.-B., Xing, J.-M., Luo, M.-F., Liu, H.-Z., Chen, J.-Y., 2003. Immobilization of Pseudomonas delafieldii with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization. Biotechnol. Lett. 25, 1977–1981.

Shi X. B., Rao N. N., Kornberg A., 2004. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17061–17065.

Sicard C., Brayner R., Margueritat J., Hémadi M., Couté A., Yéprémian C., Djediat C., Aubard J., Fiévet F., Livage J., Coradin T., 2010. Nano-gold biosynthesis by silica encapsulated micro-algae: a ''living'' bio-hybrid material. *J. Mater. Chem.* 20, 9342.

Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., 2000. Chimie des milieux aquatiques (4ème édition) *Dunod Paris*

Silva, K.T., Leao, P.E., Abreu, F., Lopez, J.A., Gutarra, M.L., Farina, M., Bazylinski, D.A., Freire, D.M.G., Lins, U., 2013. Optimization of Magnetosome Production and Growth by the Magnetotactic Vibrio Magnetovibrio blakemorei Strain MV-1 through a Statistics-Based Experimental Design. Appl Environ Microbiol 79, 2823–2827.

Simmons, S.L., Sievert, S.M., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Edwards, K.J., 2004. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6230–6239.

Sirmatel, O., Sert, C., Sirmatel, F., Selek, S., Yokus, B., 2007. Total antioxidant capacity, total oxidant status and oxidative stress index in the men exposed to 1.5 T static magnetic field. *Gen. Physiol. Biophys.* 26, 86–90.

Snowball, I., Sandgren, P., Petterson, G., 1999. The mineral magnetic properties of an annually laminated Holocene lake-sediment sequence in northern Sweden. *The Holocene* 9, 353–362.

Solov'yov, I. A. & Schulten, K. 2009. Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide. *Biophys. J.* 96, 4804–4813.

Solov'yov, I. A., Chandler, D. E. & Schulten, K. 2007. Magnetic field effects in Arabidopsis thaliana cryptochrome-1. *Biophys. J.* 92, 2711–2726.

Soltmann H., Böttcher H., 2008. Utilization of sol–gel ceramics for the immobilization of living microorganisms. *J Sol-Gel Sci. Technol*. 1-2, 66.

Song, H.-P., Li, X.-G., Sun, J.-S., Xu, S.-M., Han, X., 2008. Application of a magnetotactic bacterium, Stenotrophomonas sp. to the removal of Au(III) from contaminated wastewater with a magnetic separator. Chemosphere 72, 616–621.

Sousa R., 1995. Use of glycerol and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Cryst.* 51, 271–277.

St. Pierre T.G., Dobson J., 2000. Theoretical evaluation of cell membrane ion channel activation by applied magnetic fields. *Eur. Biophys. J.* 29, 455–456.

Staniland, S., Ward, B., Harrison, A., Van der Laan, G., Telling, N., 2007. Rapid magnetosome formation shown by real-time x-ray magnetic circular dichroism. Proceedings of the National *Academy of Sciences* 104, 19524–19528.

Staniland, S., Williams, W., Telling, N., Laan, G.V.D., Harrison, A., Ward, B., 2008. Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo. *Nat Nano* 3, 158–162.

Staniland, S.S., Moisescu, C., Benning, L.G., 2010. Cell division in magnetotactic bacteria splits magnetosome chain in half. J. Basic Microbiol. 50, 392–396.

Strasák, L., Vetterl, V., Smarda, J., 2002. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria Escherichia coli. *Bioelectrochemistry* 55, 161–164.

Taoka, A., Asada, R., Sasaki, H., Anzawa, K., Wu, L.-F., Fukumori, Y., 2006. Spatial localizations of Mam22 and Mam12 in the magnetosomes of Magnetospirillum magnetotacticum. J. Bacteriol. 188, 3805–3812.

Tartaj, P., Morales, M. del P., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., Serna, C.J., 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. J. Phys. D: Appl. Phys. 36, R182.

Teodori, L., Gohde, W., Valente, M.G., Tagliaferri, F., Coletti, D., Perniconi, B., Bergamaschi, A., Cerella, C., Ghibelli, L., 2002a. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cytometry* 49, 143–149.

Teodori, L., Grabarek, J., Smolewski, P., Ghibelli, L., Bergamaschi, A., De Nicola, M., Darzynkiewicz, Z., 2002b. Exposure of cells to static magnetic fields accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. *Cytometry* 49, 113–118.

Theil, E.C., 1987. Ferritin: Structure, Gene Regulation, and Cellular Function in Animals, Plants, and Microorganisms. Annual Review of Biochemistry 56, 289–315.

Torbet, J., Ronziere, M-C., 1984. Magnetic alignment of collagen during self-assembly. *Biochem. J.* 219, 1057–1059.

Triampo, W., Doungchawee, G., Triampo, D., Wong-Ekkabut, J., Tang, I.-M., 2004. Effects of static magnetic field on growth of leptospire, Leptospira interrogans serovar canicola: immunoreactivity and cell division. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 182–186.

Turova N.Y., Turevskaya E P., Kessler V G., Yanovskaya M I., 2002. The Chemistry of metal alkoxides

Uchida, S., Houjo, M., Tochikubo, F., 2008. Efficient sterilization of bacteria by pulse electric field in micro-gap. *Journal of Electrostatics* 66, 427–431.

Vali, H., Förster, O., Amarantidis, G., Petersen, N., 1987. Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments. *Earth and Planetary Science Letters* 86, 389–400.

Verwey, E.J.W., 1939. Electronic Conduction of Magnetite (Fe3O4) and its Transition Point at Low Temperatures. Nature 144, 327–328.

Viau, G., Fiévet-Vincent, F., Fiévet, F., 1996. Nucleation and growth of bimetallic CoNi and FeNi monodisperse particles prepared in polyols. Solid State Ionics 84, 259–270.

Walcott C., Gould J. L., Kirschvink J. L., 1979. Pigeons have magnets. *Science* 205, 1027-1029.

Walcott, C., Green, R.P., 1974. Orientation of homing pigeons altered by a change in the direction of an applied magnetic field. Science 184, 180–182.

Walker, M. M., Diebel, C. E., Haugh, C. V., Pankhurst, P. M., Montgomery, J. C. & Green, C. R. 1997. Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* 390, 371–376.

Walker, M.M., Kirschvink, J.L., Chang, S.-B.R., Dizon, A.E., 1984. A Candidate Magnetic Sense Organ in the Yellowfin Tuna, Thunnus albacares. *Science* 224, 751–753.

Walters C. C., Margulisa L. Barghoorn E. S., 1977. On the experiemntal silicification of microorganisms. I. Microbial growth on organosilicon compounds. *Precambrian Res*. 5, 241.

Walz, F., 2002. The Verwey transition - a topical review. J. Phys.: Condens. Matter 14, R285.

Wang, K. & Ritz, T. 2006. Zeeman resonances for radical-pair reactions in weak static magnetic fields. *Mol. Phys.* 104, 1649–1658.

Wang, X., Liang, L., 2009 (b). Effects of static magnetic field on magnetosome formation and expression of mamA, mms13, mms6 and magA in Magnetospirillum magneticum AMB-1. Bioelectromagnetics 30, 313–321.

Wang, X., Liang, L., Song, T., Wu, L., 2008 (a). Sinusoidal magnetic field stimulates magnetosome formation and affects mamA, mms13, mms6, and magA expression in Magnetospirillum magneticum AMB-1. Can. J. Microbiol. 54, 1016–1022.

Wang, X., Liang, L., Song, T., Wu, L., 2009 (a). Magnetosome formation and expression of mamA, mms13, mms6 and magA in Magnetospirillum magneticum AMB-1 exposed to pulsed magnetic field. Curr. Microbiol. 59, 221–226.

Wang, X.K., Ma, Q.F., Jiang, W., Lv, J., Pan, W.D., Song, T., Wu, L.-F., 2008 (b). Effects of Hypomagnetic Field on Magnetosome Formation of Magnetospirillum Magneticum AMB-1. Geomicrobiology Journal 25, 296–303.

Wang, Y., Zhang, L., Li, S., Jena, P., 2009. Polyol-Mediated Synthesis of Ultrafine TiO2 Nanocrystals and Tailored Physiochemical Properties by Ni Doping. J. Phys. Chem. C 113, 9210–9217.

Wedepohl, K.H., 1969. Handbook of geochemistry. Executive editor: K.H. Wedepohl. Editorial board: C.W. Correns [and others]. Springer, Berlin.

Wiltschko, R. & Wiltschko, W. 1995. Magnetic orientation in animals. Berlin, Germany: Springer.

Wiltschko, R., Munro, U., Ford, H., Stapput, K. & Wiltschko, W. 2008. Light-dependent magnetoreception: orientation behaviour of migratory birds under dim red light. *J. Exp. Biol.* 211, 3344–3350.

Wiltschko, W. & Wiltschko, R. 2002. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften* 89, 445–452.

Wong, T., McGrath, J.A., Navsaria, H., 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br. J. Dermatol.* 156, 1149–1155.

World Health Organisation (WHO), 1987. “Magnetic Fields, Environmental Health Criteria 69,” Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO), 2006. Static Fields. *Environmental Health Criteria*, 232, Geneva, Switzerland.

Xie, J., Liu, G., Eden, H.S., Ai, H., Chen, X., 2011. Surface-engineered magnetic nanoparticle platforms for cancer imaging and therapy. Acc. Chem. Res. 44, 883–892.

Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Liu, H., Yin, H., Li, H., 2012. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. Microbiological Research 167, 507–519.

Yang C-D., Takeyama H., Tanaka T., Matsunaga T., 2001 (b). Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 13–19.

Yang, C.D., Takeyama, H., Tanaka, T., Hasegawa, A., Matsunaga, T., 2001 (a). Synthesis of bacterial magnetic particles during cell cycle of Magnetospirillum magneticum AMB-1. Appl. Biochem. Biotechnol. 91-93, 155–160.

Yang, J., Li, S., Huang, X., Tang, T., Jiang, W., Zhang, T., Li, Y., 2013. A key time point for cell growth and magnetosome synthesis of Magnetospirillum gryphiswaldense based on real-time analysis of physiological factors. Magnetospirillum gryphiswaldense 4, 210.

Yang, W., Li, R., Peng, T., Zhang, Y., Jiang, W., Li, Y., Li, J., 2010. mamO and mamE genes are essential for magnetosome crystal biomineralization in Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1. Res. Microbiol. 161, 701–705.

Yokoyama K., Saka F., Kai T., Soeda E., 1990. Encapsulation of cells in agarose beads for use in the construction of human DNA libraries as yeast artificial chromosomes (YAC). *Jinrui Idengaku Zasshi* 35 (2), 131-143.

Yu D., Volponi J., Chhabra S., Brinker C. J., Mulchandani A., Singh A. K., 2005. Aqueous Sol-Gel Encapsulation of Genetically Engineered *Moraxella* spp. Cells for the Detection of Organophosphates. *Biosens. Bioelection.* 20, 1433–1437.

Zapka, M., Heyers, D., Hein, C.M., Engels, S., Schneider, N.-L., Hans, J., Weiler, S., Dreyer, D., Kishkinev, D., Wild, J.M., Mouritsen, H., 2009. Visual but not trigeminal mediation of magnetic compass information in a migratory bird. Nature 461, 1274–1277.

Zhang H., Ishige K., Kornberg A., 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16678–16683.

Zhao, L., Wu, D., Wu, L.-F., Song, T., 2007. A simple and accurate method for quantification of magnetosomes in magnetotactic bacteria by common spectrophotometer. J. Biochem. Biophys. Methods 70, 377–383.

Zmyslony, M., Jajte, J., Rajkowska, E., Szmigielski, S., 1998. Weak (5 MT) Static Magnetic Field Stimulates Lipid Peroxidation in Isolated Rat Liver Microsomes In Vitro. Electromagnetic Biology and Medicine 17, 109–113.

Zmyslony, M., Palus, J., Jajte, J., Dziubaltowska, E., Rajkowska, E., 2000. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutat. Res.* 453, 89–96.

Zoeger J., Dunn J., Fuller M., 1980. Magnetic material in the head of a dolphin (abst.). *Trans.Am. geophys. Urn.* 61, 225.

Annexes

PARTIE CARACTERISATIONS DES MATERIAUX

- **Annexe 1 : Séchage par CO2 supercritique**

Conditions expérimentales :

Une heure après la conception des gels, ceux-ci sont cassés au moyen d'une spatule puis déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50 %, 70 %, 90 %, 95 %) pendant 15 min puis on effectue deux bains successifs dans l'éthanol à 100 % pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite transférés dans des capsules microporeuses et immergés dans une chambre à autoclave contenant de l'éthanol à 100 %. L'utilisation de l'éthanol au cours du séchage présente un intérêt car le CO_2 liquide est miscible avec ce solvant.

Pour effectuer le séchage en milieu supercritique, la chambre est tout d'abord refroidie à 10°C puis du CO_2 est injecté dans l'éthanol. Le solvant est progressivement remplacé par du CO_2 liquide injecté au cours de différents cycles. Une fois que tout le solvant est éliminé de la chambre par des cycles d'évacuation d'éthanol et d'injection de CO_2 liquide, la chambre est chauffée. La température et la pression vont alors augmenter et dépasser le point critique du CO_2 situé à 31°C et 74 bar. Une fois que la chambre atteint une température de 40°C, le fluide à l'état supercritique est alors évacué progressivement à un débit constant. Suite à l'abaissement de la pression à la fin de l'extraction, le fluide supercritique passe à l'état gazeux. Les échantillons secs sont ensuite récupérés de la chambre.

- **Annexe 2 : Diffraction des rayons X (DRX)**

Conditions expérimentales :

L'analyse des poudres de nanoparticules ou d'aérogel est effectuée au moyen d'un goniomètre horizontal X'pert Pro de la marque Panalytical utilisant la raie Kα du cobalt dans un intervalle angulaire en 2θ allant de 10° à 100° avec un pas de 0.033° et un temps de comptage de 59 secondes par pas.

- **Annexe 3 : Mesures de la surface spécifique par adsorption-désorption d'azote**

Conditions expérimentales :

La porosité des gels est déterminée sur des aérogels âgés de 1h. Afin d'éliminer l'eau physisorbée à la surface et à l'intérieur des pores, les aérogels sont dégazés pendant une nuit à 103°C. Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K sont réalisées au moyen d'un sorptomètre Micromeritics ASAP 2010. La surface spécifique (S_{BET}) est obtenue par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) et le volume poreux est calculé par la méthode BJH (Barret-Joyner-Halenda).

- **Annexe 4 : Microscopie Electronique en Transmission (MET)**

Protocoles de préparation des échantillons :

a) Protocole de préparation des nanoparticules

Les suspensions de nanoparticules sont placées au bain à ultrason pendant 10 min pour permettre une bonne redispersion puis 10 µl sont ajoutés sur une grille de cuivre préalablement couverte d'un film fin de carbone. La goutte est ensuite absorbée sur du papier watman.

b) Protocole de préparation des échantillons biologiques

L'observation des échantillons biologiques pour l'étude des ultrastructures nécessite plusieurs étapes de préparation : une fixation (pour la préservation des structures), une deshydratation, une inclusion de l'échantillon dans de la résine, une confection de coupes ultrafines (100 nm d'épaisseur) et un contraste de celles-ci.

Les gels contenant les bactéries sont tout d'abord découpés sous forme de cubes de 2 à 4 mm d'épaisseur au moyen d'une lame de rasoir. Les échantillons sont ensuite immergés dans différents bains pendant un temps bien défini. Les différentes étapes de préparation sont décrites ci-dessous :

Etapes de fixation :

- Fixation dans une solution de glutaraldéhyde : 1h à 4°C dans un bain de 1 volume de glutaraldéhyde à 8 % et 2,2 volumes de tampon cacodylate de sodium 0,05 M (pH 7,4).

- Lavages : 3 bains successifs de 10 min dans un mélange de 1 volume de tampon cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 7,4) et 1 volume de saccharose à 0,6 M.
- Fixation dans une solution d'osmium à 2 % : 1h à 4°C dans un bain de 2 volumes de tétroxyde d'osmium à 4 %, 1 volume de saccharose à 0,6 M et 1 volume de tampon cacodylate de sodium à 0,4 M (pH 7,4).
- Lavages : 3 bains successifs de 10 min dans un mélange de 1 volume de tampon cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 7,4) et 1 volume de saccharose à 0,6 M.

Etapes de deshydratation :

Il s'agit de passages successifs des échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante. L'eau contenue dans les cellules va ensuite être progressivement remplacée par un liquide hydrophobe (oxyde de propylène). Cette étape est indispensable pour pouvoir réaliser des inclusions dans une résine miscible avec ce liquide. Les temps de déshydratation doivent être respectés afin de préserver l'intégrité des cellules.

- 5 min dans un bain d'alcool à 50 %, 70 % et 95 %.
- 10 min dans un bain d'alcool de 100 % (2 bains successifs).
- 10 min dans un bain de 1 volume d'alcool 100 % et 1 volume d'oxyde de propylène
- 10 min dans un bain d'oxyde de propylène (ce dernier est miscible avec la résine et facilite l'entrée de celle-ci à l'intérieur de l'échantillon).

Etapes d'imprégnation dans la résine :

- 1h dans un bain de ¾ de volume d'oxyde de propylène et ¼ de volume d'une solution d'Araldite (20 ml Araldite CY212, 22 ml de durcisseur DDSA et 1,1 ml d'accélérateur BDMA)
- 1 nuit à 4°C dans un bain de ¼ de volume d'oxyde de propylène et ¾ de volume de solution d'Araldite
- 1h dans une solution d'Araldite
- 3h dans une nouvelle solution d'Araldite

Etapes d'inclusion dans la résine :

- Les échantillons sont ensuite placés dans des moules préalablement remplis de la solution d'Araldite
- Polymérisation de la résine : 3 jours à 60°C

Réalisation des coupes :

- Les coupes des échantillons biologiques ont été réalisées par Annie Anglo et Bernard Haye au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP) au moyen d'un ultramicrotome.
- Les coupes de 100 nm d'épaisseur sont ensuite placées sur des grilles de cuivre préalablement couvertes d'un film de carbone puis contrastées (ou non) au moyen d'une solution d'acétate d'uranyle (1 volume d'acétate d'uranyle à 5 % et 1 volume d'alcool à 100 %).

c) Protocole de préparation des bactéries extraites des gels

Les gels bactériens sont dilués dans 5 ml de tampon phosphate puis cassés au moyen d'une spatule stérile. Les bactéries sont ensuite extraites des gels à l'aide de billes de verre de 4 mm d'épaisseur sous agitation pendant 15 min. 1 ml de la suspension bactérienne est ensuite diluée dans 9 ml de tampon phosphate contenant 20 % de glycérol. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la préparation des grilles pour l'observation en microscopie.

Après décongélation des échantillons, la suspension est centrifugée à 600 x g à 10°C afin de faire sédimenter les agrégats de gel. Le surnageant (contenant les bactéries) est ensuite récupéré (9 ml) et dilué dans 40 ml de tampon phosphate puis centrifugé à 6000 x g à 10°C pendant 15 min. Le surnageant est ensuite retiré au moyen d'une pipette. A cette étape, les bactéries ne forment pas un culot visible en raison de leur faible concentration. Le surnageant est alors retiré de manière à obtenir un volume de 3 ml au fond du tube. Les 3 ml de suspension sont homogénéisés puis placés très rapidement au vortex.

10 µl de cette suspension bactérienne sont ensuite placés sur une grille de cuivre couverte d'un film de carbone. Les grilles sont ensuite séchées à 30°C pendant 3h pour permettre la sédimentation des bactéries sur le film de carbone. Une fois, les grilles sèches, 10 µl de solution de glutaraldéhyde (1 volume de glutaraldéhyde à 8 % et 2,2 volumes de tampon cacodylate de sodium 0,05 M) sont ajoutés puis les grilles sont placées à 4°C pendant 1h dans un récipient fermé pour éviter l'évaporation du fixateur. Après avoir fixé les bactéries, la solution de glutaraldéhyde est absorbée sur du papier watman puis les échantillons sont lavés une fois à l'eau milliQ. Pour cela, la grille est placée et agitée au dessus d'une goutte d'eau située sur un parafilm (technique de lavage utilisée par Matthieu Amor, doctorant à l'IMPMC). Le surplus d'eau est ensuite absorbé sur du papier watman.

L'étape de fixation des bactéries sur les grilles est facultative. En effet, les bactéries peuvent être observées directement au MET après avoir été déposées sur grille puis séchées pendant 3h et lavées à l'eau milliQ. Cependant la préservation des bactéries n'est pas assurée contrairement à celles fixées au glutaraldéhyde qui peuvent donc être observées plusieurs fois.

Les étapes de préparation des bactéries non encapsulées dans des gels restent identiques. Les échantillons sont décongelés puis directement dilués dans un tampon phosphate avant d'être centrifugés à 6000 x g à 10°C pendant 15 min.

- **Annexe 5 : Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

Conditions expérimentales :

Un MEB à effet de champ Zeiss Ultra 55 FEG équipé d'un système EDX Bruker a été utilisé.

a) Préparation des échantillons

Pour l'observation des gels bactériens, il est nécessaire de suivre différentes étapes de préparation : une fixation, une déshydration et un séchage. Les gels sont cassés au moyen d'une spatule puis on effectue différents bains d'un volume de 3 ml pour 3 ml de gel.

Etapes de fixation :

- Fixation dans une solution de glutaraldéhyde : 1h à 4°C dans un bain de 1 volume de glutaraldéhyde à 8 % et 2,2 volumes de tampon cacodylate de sodium 0,05 M (pH 7,4).
- Lavages : 3 bains successifs de 10 min dans un mélange de 1 volume de tampon cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 7,4) et 1 volume de saccharose à 0,6 M.

Etapes de déshydratation :

- 15 min dans un bain d'alcool à 50 %, 70 % et 95 %.
- 10 min dans un bain d'alcool de 100 % (2 bains successifs).

Séchage par point supercritique

La poudre d'aérogel contenant des bactéries est ensuite placée sur un plot métallique. L'échantillon est ensuite métallisé avec du carbone ou de l'or avant les observations.

- **Annexe 6 : Analyse Thermogravimétrique (ATG)**

Conditions expérimentales :

Les mesures de pertes de masse sont réalisées pour une rampe de température de 5°C/min au moyen d'un appareil ATG-ATD Labsys Evo de la marque Setaram. Les échantillons sont placés sous atmosphère oxydante (air) puis chauffés jusqu'à 1000°C.

- **Annexe 7 : Mesures magnétiques**

Les mesures magnétiques des différents échantillons ont été effectuées sous la responsabilité de Yohan Guyodo (IMPMC), en utilisant la plateforme de mesures magnétiques IPGP-IMPMC située à l'Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP).

A. Vibrating Sample Magnetometer (VSM) ou magnétomètre à échantillon vibrant

Principe

L'objectif des mesures VSM est de quantifier les variations de l'aimantation (M) d'un échantillon de masse connue en fonction d'un champ magnétique appliqué. Dans la pratique, un échantillon est placé entre deux bobines de détection (pick-up coils). Un champ magnétique externe peut être appliqué à l'aide d'un électro-aimant, faisant ainsi varier l'aimantation de l'échantillon. L'échantillon subit alors une vibration sinusoïdale verticale d'amplitude fixe, ce qui induit un courant alternatif dans les bobines de détection, dont la tension correspondante mesurée est proportionnelle au moment magnétique de l'échantillon. Cette méthode de caractérisation permet de tracer les courbes d'aimantation d'un échantillon. Par exemple, un cycle d'hystéresis peut être obtenu pour les particules monodomaines stables et permet donc de déterminer les valeurs de l'aimantation à saturation (Ms) et rémanente (Mr) ainsi que le champ coercitif (Hc). La valeur du champ coercitif (Hcr) nécessaire pour annuler l'aimantation rémanente peut également être mesurée. Pour cela, un champ magnétique suffisamment fort est appliqué au niveau de l'échantillon de façon à atteindre la saturation de celui-ci. Le champ maximal pouvant être appliqué est de 2T environ, mais dans la plupart des cas les échantillons sont saturés à des valeurs du champ bien inférieures. Une fois le champ coupé, on obtient une valeur d'aimantation rémanente. Un petit champ négatif de quelques mT est alors appliqué sur l'échantillon, ce qui conduit à une légère diminution de l'aimantation (certains grains vont conserver leur aimantation). Une nouvelle mesure de l'aimantation rémanente est alors pratiquée en champ nul. De nouvelles étapes de désaimantation sont ensuite appliquées, en

augmantant progressivement la valeur du champ négatif. Une fois que la valeur d'aimantation rémanente est nulle, on peut ainsi déterminer la valeur du champ coercitif (Fig. 1).

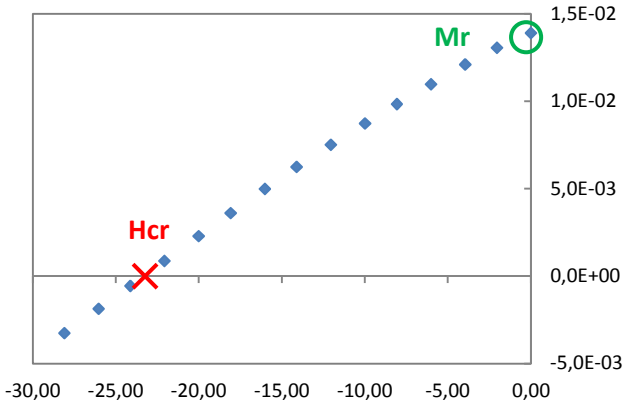


Figure 1 : Aimantation (mAm2) en fonction du champ négatif appliqué (mT)

Conditions expérimentales :

Une fois les échantillons pesés dans une gélule en gélatine, celle-ci est placée au bout d'une paille en plastique avant d'être positionnée dans l'appareil entre deux électroaimants. Les mesures sont réalisées avec un magnétomètre VSM Modèle 3900 de Princeton Measurements Corporation à température ambiante (300 K) préalablement calibré avec un standard d'yttrium du NIST (National Institute of Standards and Technology, USA).

B. Le MPMS (Magnetic Property Measurement System) à SQUID

Conditions expérimentales :

La préparation des échantillons pour les mesures au MPMS s'effectue de la même manière que pour le magnétomètre à échantillon vibrant, c'est à dire avec un conditionnement en gélules au sein d'une paille. L'analyse des nanoparticules de magnétite, des aérogels magnétiques et des aérogels bactériens a permis d'obtenir des courbes d'aimantations en fonction du champ appliqué à basse température (10 K), ainsi que les aimantations induites avec un champ faible de 5. 10^{-3} T en fonction de la température (entre 10 et 300 K). Ces aimantations induites peuvent être obtenues après refroidissement de l'échantillon en champ nul (Mzfc : zero field cooling) ou sous champ (Mfc : field cooling). Afin d'identifier la transition de Verwey pour les magnétosomes, les bactéries encapsulées dans les aérogels de silice ont été analysées selon plusieurs modes :

- Aimantation rémanentes acquises à 10K en champ fort (2,5 T) après refroidissement en champ nul (ZFC) ou champ fort (2,5 T), mesurées entre 10 K et 300 K.

- Aimantations rémanentes acquises à température ambiante en champ fort (2,5 T) (RTSIRM : Room Temperature Saturation Isothermal Remanent Magnetization) puis cyclées en température entre 300 K et 10 K, puis entre 10 K et 300 K.

- **Annexe 8 : Stabilité des suspensions de nanoparticules**

A. Potentiel zêta

Conditions expérimentales :

Les suspensions de nanoparticules de magnétite sont préparées à une concentration de 0,04 g/l. Les mesures de mobilité électrophorétique sont réalisées au moyen d'un zetasizer Nano ZS de la marque Malvern sur une suspension contenant de l'eau milliQ et sur une suspension avec du glycérol à 10 %. L'indice de réfraction et l'absorbance des particules sont deux paramètres importants dans l'analyse. Pour la magnétite, ils ont été fixés respectivement à 2,42 et 1. D'autres paramètres ont été fixés : la viscosité, l'indice de réfraction et la constante diélectrique du milieu (cf. tableau ci-dessous).

Tableau 1 : Paramètres utilisés pour les mesures de potentiel zêta

	Solutions	
paramètres	**10% glycérol**	**eau MilliQ**
viscosité (20°C) mPa.s	1,31	1
indice de réfraction (20°C)	1,34	1,33
constante diélectrique (20°C)	77,55	80,3

Les suspensions de nanoparticules sont placées dans une cellule en plastique munie d'une électrode en or. L'échantillon est agité avant toute mesure afin d'éviter la sédimentation des particules.

B. La diffusion dynamique de lumière

Conditions expérimentales :

L'appareil utilisé est un nanosizer nanoZS de la marque Malvern équipé d'un laser (λ = 633 nm). Les paramètres fixés sont l'indice de réfraction de la magnétite (2,42), l'absorbance de celle-ci (1) et la viscosité du milieu (1,31 pour la suspension avec 10 % de glycérol et 1 pour la suspension

dans l'eau). Les suspensions de magnétite à une concentration de 0,04 g/l sont soniquées pendant 10 min puis placées dans une cuve en PS et homogénéisées. L'appareil va alors déterminer le diamètre hydrodynamique et la distribution de taille qui peut être exprimée en intensité, nombre de particules ou volume.

PARTIE MICROBIOLOGIE

- **Annexe 9 : Mise en culture des différentes bactéries**

A. Mise en culture des bactéries *Escherichia coli*

Composition des milieux de culture

Milieu de conservation : Extrait de viande (4 g), peptone (10 g), chlorure de sodium (5 g), agar (10 g)
Milieu Luria Bertani (LB) pour 1 L : tryptone (10 g), extrait de levure (5 g), NaCl (10 g), pH 7
Milieu phosphaté contenant 20 mM de glucose (Milieu minimum phosphate glucose) pour 1 L : NaH_2PO_4 (34 mM), K_2HPO_4 (64 mM), $MgSO_4$ (0,3 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (20 mM), glucose (20 mM), pH 7
Le milieu LB est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Le milieu minimum est stérilisé par filtration à 0,2 µm.

Préparation des précultures

Les bactéries *E.coli* de la souche ICP 54125 conservées à -80°C sont inoculées dans un tube contenant 3 ml de milieu de conservation. Ce type de milieu permet la conservation des bactéries à 20°C sur une période de 6 mois. Pour la préparation des précultures, les bactéries contenues dans le milieu gélosé sont inoculées dans un flacon contenant 10 ml de milieu LB. La préculture est ensuite placée à 37°C sous agitation (150 rpm) pendant 7h. Cette première préculture est ensuite repiquée dans un nouveau milieu LB puis incubée toute la nuit à 37°C à 150 rpm.

Préparation de la culture

Une culture est ensuite préparée dans un milieu moins riche en ajoutant 600 µl de la dernière préculture dans un bécher contenant 100 ml de milieu phosphate et 20 mM de glucose. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C à 150 rpm pendant 4h. Pour réaliser des courbes de croissance, les bactéries sont cultivées dans le milieu minimum phosphate avec 20 mM de glucose pendant 24h.

Une mesure d'absorbance (λ = 600 nm) est réalisée avec un spectrophotomètre toutes les 30 min en début de croissance puis toutes les heures. Les valeurs d'absorbance sont directement liées à la concentration en bactéries suivant la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = c.\ l.\ \varepsilon_\lambda$.

La courbe de croissance des bactéries en général présente 4 phases (Fig. 1) :

- une phase de latence : les bactéries vont s'adapter à leur nouveau milieu.

- une phase exponentielle : durant cette phase de croissance, les bactéries sont toutes dans le même état physiologique. Le milieu de culture apporte tous les nutriments nécessaires pour leur croissance optimale.

- une phase stationnaire : les sources nutritives deviennent limitées, ce qui conduit à un stress. Les bactéries se retrouvent dans des états physiologiques différents. Certaines vont pouvoir s'adapter aux nouvelles conditions tandis que d'autres ne vont pas pouvoir survivre en raison du stress trop important et vont donc devenir une source nutritive pour les bactéries les plus résistantes. Au cours de cette phase, la mort des bactéries compense leur multiplication.

- une phase de déclin : comme les nutriments sont épuisés, les bactéries vont mourir progressivement.

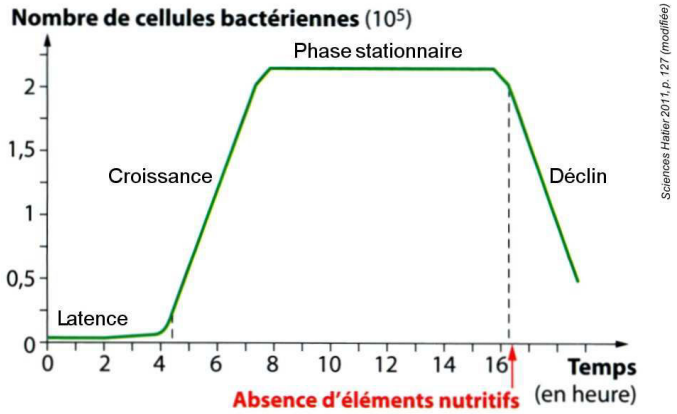


Figure 1 : Courbe de croissance des bactéries représentée en nombre de cellules en fonction du temps

B. Mise en culture des bactéries *Magnetospirillum magneticum*

Composition des milieux de culture

Milieu de culture A pour 1 L : KH_2PO_4 (0,68 g), acide succinique (0,37 g), acide tartrique (0,37 g), acétate de sodium (0,05 g), nitrate de sodium (0,12 g), acide ascorbique (0,035 g), solution de

vitamines de Wolfe (10 ml), solution minérale de Wolfe (5 ml), solution de quinate ferrique (0,01 M de fer) (2 ml)

Milieu de culture B pour 1 L : KH_2PO_4 (0,68 g), acide succinique (0,37 g), acide tartrique (0,37 g), acétate de sodium (0,05 g), nitrate de sodium (0,12 g), acide ascorbique (0,035 g), solution de vitamines de Wolfe (10 ml), solution minérale de Wolfe (5 ml).

Solution de vitamines de Wolfe : biotine (2 mg), acide folique (2 mg), pyridoxine (10 mg), thiamine (5 mg), riboflavine (5 mg), acide nicotinique (5 mg), acide panthoténique (5 mg), vitamine B12 (0,1 mg), acide aminobenzoïque (5 mg), acide thioctique (5 mg).

Solution minérale de Wolfe (non ATCC) pour 1 L : Acide nitrilotriacétique (0,5 g), $MgSO_4$. $7H_2O$ (1,5 g), $MnSO_4$. H_2O (1 g), NaCl (0,5 g), $FeSO_4$. 7 H_2O (0,1 g), $CoNO_3$. 6 H_2O (0,1 g), $CaCl_2$ (0,1 g), $ZnSO_4$. 7 H_2O (0,1 g), $CuSO_4$. 5 H_2O (0,01 g), $AlK(SO_4)_2$. 12 H_2O (0,01 g), H_3BO_3 (0,01 g), Na_2MoO_4 (0,01 g), Na_2SeO_3 (0,002 g), EDTA (0,5 g).

Le milieu A est utilisé pour obtenir une culture de bactéries avec des magnétosomes et le milieu B pour avoir des cellules sans magnétosomes. Le pH des différents milieux de culture A et B est ajusté à 6,75 grâce à une solution de NaOH à 1 M. Le milieu de culture est ensuite stérilisé soit par filtration à 0,2 µm soit au moyen d'un autoclave (à 120°C) puis celui-ci est conservé à 4°C pendant 1 mois.

Préparation d'une culture avec magnétosomes

La souche *Magnetospirillum magneticum* certifiée ATCC 700264, conservée à -80°C, est inoculée entièrement (1,8 ml) dans un tube de 15 ml de milieu A. La suspension est ensuite incubée à 30°C pendant 4 à 10 jours. Les conditions vont alors devenir progressivement microoxiques permettant ainsi aux bactéries de produire des magnétosomes. Lorsque le milieu devient trouble et que l'on observe un petit sédiment marron au fond du tube, la préparation de la culture peut se faire. Cette étape de mise en préculture était effectuée par la start-up Nanobactérie pour la préparation de mes propres cultures par la suite.

10 ml de préculture sont alors ajoutés dans une bouteille de 1L contenant 1L de milieu A. La culture est ensuite placée à 30°C pendant 7 jours. L'observation des cellules magnétiques peut se faire en plaçant la bouteille sur un agitateur magnétique. Les cellules vont alors tourner sous l'effet du champ magnétique.

Au bout de 7 jours d'incubation, la culture peut soit être directement utilisée pour les encapsulations ou pour la préparation des cultures de bactéries sans magnétosomes. A cette étape, elle peut également être conservée à 4°C pendant 1 mois maximum ou indéfiniment à -80°C avec 20% de glycérol. Pour la conservation au réfrigérateur, il est préférable de ne pas dépasser 2 mois. En effet, plus la conservation est longue plus les bactéries perdent leur capacité à produire des magnétosomes. Pour le stockage à -80°C, un volume de 10 ml de culture est centrifugé à 6000 x g pendant 30 min à 5°C puis resuspendu dans 10 ml de milieu de culture neuf contenant 20% de glycérol. La suspension est répartie dans des tubes de conservation de 2 ml qui sont ensuite placés à -80°C.

Préparation d'une culture sans magnétosomes

Les étapes de préparation d'une culture sans magnétosomes restent identiques au protocole de mise en culture des bactéries avec magnétosomes (protocole décrit ci-dessus). Les bactéries sont d'abord cultivées avec du quinate de fer (milieu A) puis inoculées dans le milieu B (sans quinate de fer). Afin de maximiser le nombre de bactéries sans magnétosomes, il est nécessaire de réaliser tout d'abord une préculture puis une culture sans fer. 0,8 ml de culture avec magnétosomes sont ajoutés dans une bouteille de 100 ml contenant 80 ml de milieu B. La préculture est ensuite placée à 30°C sous agitation à 130 rpm pendant 7 jours. Au bout de 7 jours, 10 ml de préculture sont ajoutés dans une bouteille de 1L contenant 1L de milieu B. Puis, la culture est incubée à 30°C sous agitation 130 rpm pendant 2 ou 7 jours selon les conditions d'encapsulation.

- **Annexe 10 : Encapsulation des bactéries**

A. Encapsulation des *Escherichia coli* sans milieu nutritif

Composition des milieux

Tampon phosphate pour 1 L : NaH_2PO_4 (34 mM), K_2HPO_4 (64 mM), $MgSO_4$ (0,3 mM), pH 7

Tampon phosphate + 10 % glycérol : NaH_2PO_4 (34 mM), K_2HPO_4 (64 mM), $MgSO_4$ (0,3 mM), 900 ml d'eau milliQ et 100 g de glycerol, pH 7

Obtention des suspensions bactériennes

Une préculture est repiquée dans un milieu minimum phosphate contenant 20 mM de glucose. Au bout de 4h d'incubation, les bactéries en phase exponentielle sont centrifugées pendant 15 min à 3000 x g à 10°C. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans du tampon phosphate puis lavé trois fois par centrifugation avec le tampon. A la fin des lavages, le culot est resuspendu dans 4 ml de tampon phosphate contenant 10 % de glycérol. Après vérification de la DO, celle-ci est ajustée à 2,5 afin d'obtenir une concentration cellulaire de 10^9 cellules/ml environ.

Encapsulation des bactéries

Les gels de silice sont ensuite préparés à partir d'un précurseur de silicate de sodium en solution (SiO_2 27 wt%, NaOH 10 wt%) provenant de chez sigma aldrich. Un mélange de silicate de sodium (0,8 M, 1 ml) et glycérol (10 wt%, 1 ml), avec ou sans nanoparticules de magnétite, est neutralisé avec de l'acide chlorhydrique (4 M, 0,155 ml) sous agitation orbitale. Après 5 secondes, un volume de 1 ml de suspension bactérienne (10^9 cellules/ml) est ajouté et la suspension est agitée durant le processus de gélification. Les gels se forment au bout de 5 à 6 min à température ambiante et sont ensuite conservés à 20°C pendant 15 jours afin de préserver la viabilité des cellules. A 20°C, le métabolisme est ralenti et la lyse cellulaire est diminuée. Pour les tests de viabilité, les gels bactériens sont redispersés dans 5 ml de tampon phosphate puis placés sous agitation magnétique pendant 1h.

B. Encapsulation des *Magnetospirillum magneticum* sans milieu nutritif

Obtention des suspensions bactériennes

Un litre de culture est préparé comme décrit précédemment dans l'annexe 9 - B pendant 7 jours. La culture est ensuite centrifugée à 6000 x g pendant 30 min à 5°C puis le culot est resuspendu dans 4 ml de tampon phosphate contenant 10 % de glycérol. Pour les bactéries cultivées sans quinate de fer (cellules non magnétiques), la DO de la suspension est ajustée à 2,5 tandis que pour les cellules magnétiques, la suspension est ajustée à une DO de 5.

Encapsulation des bactéries

Le protocole d'encapsulation reste identique à celui utilisé précédemment avec les *E.coli*. Pour les tests de viabilité, les gels contenant les cellules magnétiques sont resuspendus dans 5 ml de tampon phosphate puis cassés au moyen de billes de verre pour pouvoir extraire les bactéries. Cette

méthode permet d'éviter que les bactéries possédant des magnétosomes ne s'accrochent à l'aimant au cours de la resuspension des gels.

C. Encapsulation des *Magnetospirillum magneticum* avec un milieu nutritif et préparation des suspensions contrôles

Composition des milieux

Milieu 3 fois concentré avec 300 µM de fer : milieu de culture 3 fois concentré, 300 µM de quinate de fer, 10 % glycérol, pH 6,75

Milieu 3 fois concentré avec 60 µM de fer : milieu de culture 3 fois concentré, 60 µM de quinate de fer, 10 % glycérol, pH 6,75

Milieu avec 300 µM de fer : milieu de culture, 300 µM de quinate de fer, 10 % glycérol, pH 6,75

Milieu avec 60 µM de fer : milieu de culture, 60 µM de quinate de fer, 10 % glycérol, pH 6,75

Le protocole de lavage des bactéries s'effectue de la même manière que dans la partie B. Les cellules sont ensuite resuspendues dans différents milieux de culture décrits ci-dessus. Les suspensions bactériennes ajustées à une DO de 2,5 sont utilisées pour l'encapsulation (dont le protocole reste identique) et pour la préparation de suspensions contrôles permettant de comprendre l'effet de l'encapsulation. Ces dernières sont réalisées en mélangeant 1,155 ml d'eau milliQ avec 1 ml d'eau milliQ contenant 10 % de glycérol et 0,47 M de NaCl. La suspension bactérienne est ensuite ajoutée dans le mélange. La concentration finale en sels NaCl s'élève à 0,15 M comme dans les gels. Les suspensions contrôles et les gels sont ensuite utilisés à différents temps : 1, 2, 4 et 7 jours.

- **Annexe 11 : Exposition des matrices à un champ magnétique statique**

Les bactéries encapsulées dans les matrices de silice sont exposées à un champ magnétique statique créé par deux aimants placés de manière parallèle. Les aimants sont maintenus par un montage réalisé avec des plaques de plexiglas. La distance des aimants peut être ajustée afin de moduler la force du champ magnétique. Ainsi un espacement de 5 cm entre les aimants permet d'avoir un champ de 55 mT au centre du montage et de 80 mT au niveau de chaque aimant.

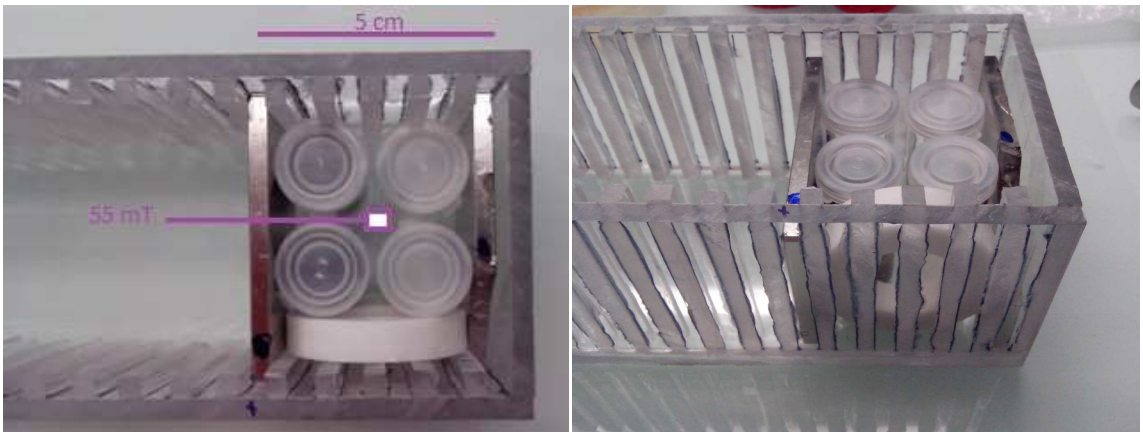


Figure 1 : Photos du montage avec les aimants

- **Annexe 12 : Viabilité des bactéries**

A. Comptages sur boîtes

Le nombre de cellules viables cultivables est déterminé après resuspension du gel dans du tampon phosphate. Une série de dilution des gels resuspendus et de la suspension initiale avant encapsulation est réalisée au 10ème dans du tampon phosphate. Pour la suspension initiale avant encapsulation, les dilutions se font jusqu'à 10^{-8}. Des volumes de 100 µl de suspension issue des dilutions à 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8} sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar. Les boîtes sont ensuite placées à 37°C durant une nuit. En ce qui concerne les gels resuspendus, des volumes de 100 µl de suspension issue de la dilution à 10^{-4} et 10^{-5} sont étalés sur boîtes de Pétri qui sont placées à 37°C pendant 1 nuit. Le nombre de colonies est alors déterminé par comptage puis corrélé en CFU/ml (Colonie Forming Unit / ml).

B. Tests Alamar Blue

L'activité métabolique peut être déterminée grâce au test alamar blue, un colorant qui se réduit au niveau de la chaîne respiratoire des cellules. La proportion de colorant réduit peut être directement corrélée à la quantité de cellules en suspension. Cette technique permet à la fois de quantifier les bactéries et de déterminer leur activité métabolique en fonction des différentes conditions. Pour déterminer l'activité métabolique des cellules, 2 ml de gel resuspendus sont dilués avec 2 ml de tampon phosphate puis 2 ml de cette suspension sont prélevés et dilués de façon successive dans 2 ml de tampon phosphate. Pour chaque dilution, 0,2 ml de résazurine à 0,01% sont ajoutés et les suspensions sont ensuite mélangées et incubées à 30°C sous agitation 130 rpm pendant 2h à l'abri de la lumière. En parallèle, 2 ml de tampon phosphate sont incubés avec 0,2 ml

de résazurine afin d'établir le contrôle. Le blanc est réalisé seulement avec du tampon phosphate. Après 2h d'incubation, les densités optiques de chaque échantillon sont déterminées à deux longueurs d'onde : 570 nm pour quantifier l'Alamar Blue réduit et 600 nm pour l'Alamar Blue oxydé. Le pourcentage d'Alamar Blue réduit peut être déterminé grâce au calcul suivant (selon U.S. Patent No. 5,501,959) :

$$\text{Pourcentage d'Alamar Blue réduit} = \frac{A_{570} \times (\varepsilon_{OX})_{600} - A_{600} \times (\varepsilon_{OX})_{570}}{A'_{600} \times (\varepsilon_{RED})_{570} - A'_{570} \times (\varepsilon_{RED})_{600}} \times 100$$

εOX = coefficient d'extinction molaire de l'Alamar Blue oxydé

εRED = coefficient d'extinction molaire de l'Alamar Blue réduit

A = absorbance de l'échantillon

A' = absorbance du contrôle négatif (tampon phosphate + Alamar Blue sans cellules).

Une droite étalon peut ainsi être établie grâce au pourcentage de réduction de l'Alamar Blue en fonction du nombre de bactéries déterminé par comptage sur boîtes. Une fois que la droite étalon est bien établie, l'équation de cette droite permet de déterminer le nombre de CFU/ml (jusqu'à 10^8 CFU/ml) sans réaliser de comptage sur boîtes. Les avantages de cette technique résident dans sa simplicité, très grande reproductibilité des résultats et le temps de dénombrement (2h au lieu de 24h).

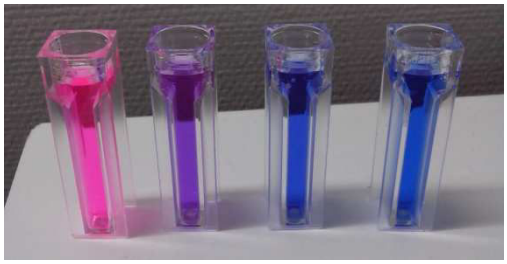


Figure 1 : Dosage de l'Alamar Blue réduit (la concentration en bactérie diminue de gauche à droite)

C. ATPmétrie

- **Extraction de l'ATP**

Le gel resuspendu est dilué au 10ème dans du tampon phosphate puis des volumes de 0,1 ml sont ajoutés dans 0,9 ml de tampon d'extraction (0,1M Tris-HCl, 2 mM d'EDTA - pH = 7,8) préalablement chauffé 3 min à 100°C. Les suspensions contenues dans le tampon d'extraction sont vortexées puis placées à 100°C pendant 3 min afin de libérer l'ATP des cellules et d'inactiver les enzymes bactériennes telles que les ATPases. A cette étape, les échantillons peuvent être conservés

dans la glace ou bien placés à -20°C si l'on souhaite finir l'extraction plus tard. L'extraction est ensuite finalisée en centrifugeant 0,9 ml d'échantillons avec 0,5 ml de billes de verre de 0,4 mm à 5000 x g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite collecté et conservé à -20°C avant les mesures d'ATP.

- **Quantification de l'ATP**

Après l'extraction, les échantillons sont incubés dans la glace jusqu'à la mesure. La solution de réactifs contenant la luciférine et luciférase est diluée 20 fois dans le buffer spécifique (kit FLAA-1KT chez Sigma Aldrich). 0,1 ml de chaque échantillon et de blancs (tampon d'extraction) sont placés dans une microplaque conservée dans la glace. Des volumes de 0,1 ml de réactifs sont ensuite ajoutés avec les échantillons et les blancs. La plaque est ensuite placée dans un lecteur EnVision de la marque PerkinElmer. Les échantillons sont agités à 900 rpm pendant 3 min à température ambiante (20-25°C) puis la quantité de lumière libérée (RLU – Relative Luminescent Units) est mesurée. Une courbe standard est effectuée en parallèle au moyen d'une solution d'ATP standard de concentration connue.

- **Annexe 13 : Suivi de la production des magnétosomes par diffusion de lumière (détermination du coefficient de magnétisme)**

Principe

Lorsqu'une cellule magnétique (contenant des magnétosomes) est exposée à un champ magnétique extérieur, celle-ci va s'aligner de manière parallèle aux lignes de champ, ce qui crée ainsi un changement de la diffusion de lumière des cellules alignées par rapport à une situation d'orientation aléatoire des cellules.

Pour des structures de taille comparable, à une certaine longueur d'onde de la lumière diffusée, l'angle de diffusion dépendra des dimensions des particules. Il existe donc une relation inverse entre les dimensions moyennes de la taille des particules et l'angle pour lequel la lumière est déviée par diffusion. Ainsi des petites particules dirigent plus de lumière à des angles de diffusion plus grands. Lorsque les cellules sont orientées de manière parallèle à la lumière, celles-ci apparaissent comme des objets de petite dimension (diamètre de la bactérie égal à 0,7 µm). Dans cette situation, la turbidité est maximale. Dans le cas contraire où les bactéries sont orientées perpendiculairement à la lumière, celles-ci apparaissent dans le sens de la longueur (1 à 3 µm), ce qui a pour conséquence de diminuer la turbidité.

Le maximum de diffusion (Emax) se produit lorsque le champ magnétique est appliqué de manière parallèle au faisceau de lumière. A l'inverse, une orientation perpendiculaire du champ conduit à une diffusion minimale (Emin). La valeur du coefficient de magnétisme (Cmag) se définit comme le ratio entre la valeur de lumière diffusée lorsque le champ magnétique est parallèle à la lumière (Emax) et la valeur de diffusion lorsque le champ est perpendiculaire (Emin).

$$C_{\text{mag}} = \frac{E_{\text{max}}}{E_{\text{min}}}$$

Le coefficient de magnétisme est maximal lorsque l'orientation magnétique est saturée c'est-à-dire si toutes les cellules sont orientées de manière parallèle aux lignes de champ. Les valeurs de Cmag peuvent être directement corrélées de manière linéaire au nombre moyen de magnétosomes par cellule ainsi qu'au pourcentage de bactéries contenant des magnétosomes (Schüler *et al.,* 1995) (Zhao *et al.,* 2007).

Conditions expérimentales

L'appareil de mesure de diffusion de lumière est constitué d'une diode (LED) dont la longueur d'onde de la lumière émise est de 637 nm. Le montage est composé d'une série de lentilles et d'un diaphragme. L'échantillon contenu dans une cuve à spectrophotomètre est placé au centre de la trajectoire du faisceau. Deux aimants placés de part et d'autre de l'échantillon peuvent être positionnés de manière parallèle ou perpendiculaire au faisceau. La lumière transmise est ensuite collectée par une photodiode. Un convertisseur va alors permettre de produire le courant généré en tension proportionnelle à l'intensité de lumière détectée. Avant chaque mesure, les suspensions de bactéries sont ajustées à une DO de 0,5 puis homogénéisées. Les mesures de Emax et Emin sont réalisées à différents temps : 1, 2, 4 et 7 jours afin de suivre la production des magnétosomes.

- **Annexe 14 : Notions sur le magnétisme**

Un électron dans un atome possède un moment magnétique orbital et de spin. L'existence d'un moment magnétique au niveau de l'atome nécessite une occupation partielle de l'orbitale atomique conduisant à la présence d'un électron célibataire.

Dans la matière condensée, le magnétisme est créé par :

- des interactions d'échange de très courtes distances, entre l'ensemble des moments magnétiques de spins

- le couplage entre les moments magnétiques orbitaux et le réseau cristallin grâce au champ cristallin produit par les charges ioniques environnantes (anisotropie magnétocristalline)

- le couplage spin-orbite qui tend à aligner les moments orbitaux de manière parallèle aux moments de spins conduisant ainsi à un moment résultant

Le schéma ci-dessous illustre ces interactions (Fig. 1).

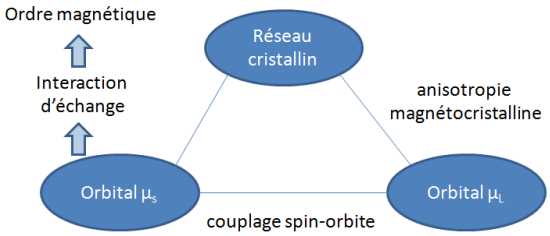


Figure 1 : Différentes contributions dans la matière (selon Degauque J., 1992)

Un matériau adopte une configuration magnétique stable en absence d'un champ magnétique. Celle-ci résulte de trois contributions énergétiques en compétition :

- Les interactions d'échange
- L'anisotropie magnétocristalline (les moments magnétiques sont alignés dans une direction cristallographique)
- Les interactions dipolaires

Il existe différents types de comportements des matériaux magnétiques : le diamagnétisme, le paramagnétisme, le ferromagnétisme, l'antiferromagnétisme et le ferrimagnétisme (Moskowitz B. M., 1991).

Les matériaux diamagnétiques et paramagnétiques ne présentent pas d'interactions magnétiques collectives et ne sont pas ordonnés magnétiquement. Dans le cas du diamagnétisme, les atomes constituant la matière ne contiennent pas d'électrons célibataires et ne possèdent donc pas de moment magnétique net (ex : eau, calcite quartz). Lorsqu'ils sont exposés à un champ magnétique, leur aimantation est très faiblement négative. En ce qui concerne les matériaux paramagnétiques, ceux-ci possèdent quelques atomes avec des électrons non appariés résultant ainsi de moments magnétiques nets qui n'interagissent pas magnétiquement les uns avec les autres (ex : argile riche en fer, carbonate, pyrite,...). En présence d'un champ magnétique, les moments

magnétiques atomiques vont s'aligner partiellement dans la direction du champ magnétique, ce qui confère au matériau une aimantation positive.

Les matériaux ferro-, anti-ferro et ferrimagnétiques présentent quand à eux des interactions fortes entre les moments magnétiques atomiques et sont ordonnés magnétiquement en dessous d'une certaine température critique. Les interactions sont produites par les forces d'échanges électroniques résultant d'un alignement parallèle ou antiparallèle des moments atomiques. Ainsi il existe trois types d'arrangements des moments magnétiques (Fig. 2):

- parallèles (ferromagnétisme) avec une aimantation nette importante même en absence d'un champ magnétique (aimantation spontanée). Ex : métaux à base de fer, nickel, cobalt

- antiparallèles avec des moments magnétiques égaux, ce qui conduit à l'absence de moment magnétique net (antiferromagnétisme). Ex : hématite

- antiparallèles avec un moment magnétique net (ferrimagnétisme). Ex : magnétite, maghémite, greigite

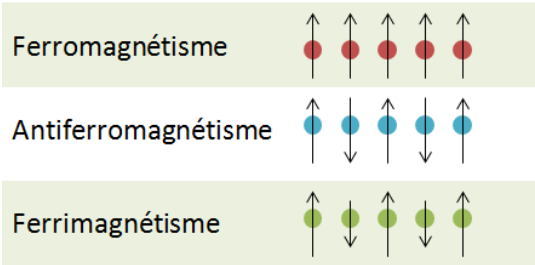


Figure 2 : Différents types de comportement magnétique

A. Les différents types d'anisotropie

La structure cristalline et la forme des grains influencent particulièrement la direction de l'aimantation (Moskowitz B. M., 1991). On parle alors d'anisotropie magnétique lorsque les propriétés magnétiques dépendent d'une direction préférentielle. Un matériau magnétique possède plusieurs types d'anisotropies : magnétocristalline, de forme, de surface et la magnétostriction.

1. Anisotropie magnétocristalline

L'anisotropie magnétocristalline est indépendante de la taille et de la forme des grains et constitue une propriété intrinsèque des matériaux ferrimagnétiques (Moskowitz B. M., 1991). Elle est directement liée à la structure cristallographique du matériau qui va s'aimanter plus aisément dans

des directions cristallographiques de "facile aimantation". Dans le cas de la magnétite, il existe trois directions possibles de l'aimantation au dessus de 130 K :

- axe [111] : direction facile de l'aimantation
- axe [100] : direction difficile de l'aimantation
- axe [110] : direction intermédiaire de l'aimantation

A température ambiante, la magnétite va s'aimanter dans l'axe [111] de facile aimantation. L'anisotropie magnétocristalline se définit comme l'énergie nécessaire pour dévier le moment magnétique d'un monocristal de l'axe de facile aimantation vers la direction difficile. Lorsque les moments magnétiques résultants μ_M sont dirigés selon l'axe de facile aimantation, l'énergie magnétocristalline est minimale (Degauque J., 1992).

2. Anisotropie de forme

L'anisotropie de forme résulte du couplage dipolaire, ce qui a pour conséquence d'orienter l'aimantation suivant la plus grande dimension de l'échantillon (Degauque J., 1992). Lorsqu'un matériau est magnétisé, il génère des charges magnétiques ou des pôles à la surface (Moskowitz B. M., 1991). La distribution de charges de surface produit un champ magnétique appelé champ démagnétisant (H_d) agissant en opposition à l'aimantation (M) qui le génère. La valeur de H_d dépend du facteur démagnétisant (N) et de l'aimantation selon la formule suivante : $H_d = -NM$. Selon le schéma ci-dessous, nous pouvons constater que H_d s'oppose au champ appliqué H_e (Fig. 3).

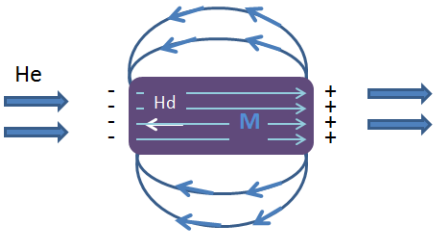


Figure 3 : Champ démagnétisant H_d résultant de la distribution de charges en surface

L'induction magnétique globale (B) du matériau s'écrit alors sous la forme suivante :

$$B = \mu_0 (H+M) \text{ où } H = H_e + H_d$$

μ_0 = perméabilité magnétique du vide et H = champ magnétique

Les matériaux sphériques ne présentent pas d'anisotropie de forme car ils sont uniformément aimantés et les facteurs démagnétisant sont isotropes dans toutes les directions.

3. Anisotropie de surface

L'environnement d'un atome à la surface des couches magnétiques est moins symétrique que dans un matériau massif, ce qui peut donc conduire à une orientation du moment magnétique perpendiculaire à la surface (Degauque J., 1992).

4. Magnétostriction

Le couplage spin-orbite peut induire des effets sur le matériau, c'est ce que l'on appelle la magnétostriction (Moskowitz B. M., 1991). Cet autre type d'anisotropie va provoquer des changements de dimension lorsqu'un matériau est magnétisé.

B. Notions sur les domaines magnétiques

La notion de domaines est un concept fondamental dans le magnétisme. Un matériau magnétique se structure spontanément en domaines afin de minimiser son énergie globale (Degauque J., 1992) (Fig. 4). On parle alors de domaines de Weiss dont chacun est aimanté à saturation dans une direction. Le nombre de domaines dépend de la taille des particules (Moskowitz B. M., 1991). Ainsi, plus les dimensions de la particule augmentent, plus celle-ci est divisée en domaines. Deux domaines adjacents possèdent une aimantation dirigée dans le sens contraire (colinéaire) et sont séparés par une couche de transition nommée paroi de Bloch.

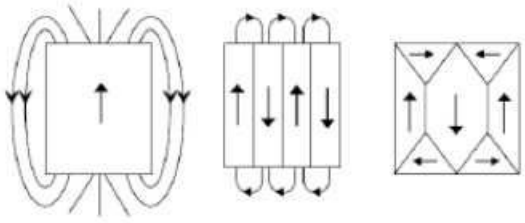


Figure 4 : Structuration en domaines (Daou T. J., 2007)

1. Cycle d'hystérésis

Les matériaux ferro- et ferrimagnétiques peuvent garder en mémoire un champ magnétique, une fois que celui-ci est retiré (Moskowitz B. M., 1991). Lorsque l'on applique un champ magnétique, le matériau va s'aimanter de manière croissante en fonction de l'intensité du champ magnétique appliqué (Fig. 5). Le minéral peut atteindre la saturation (aimantation à saturation nommée Ms). Puis lorsque la force du champ appliqué diminue jusqu'à 0, il persiste alors une aimantation que l'on

appelle aimantation rémanente (Mr). Quand le champ appliqué augmente dans une direction négative, l'aimantation va arriver à une valeur nulle correspondant au champ coercitif (Hc). Lorsque le champ augmente au delà de la coercivité, le matériau atteint la saturation dans la direction négative. L'ensemble forme un cycle d'hystérésis.

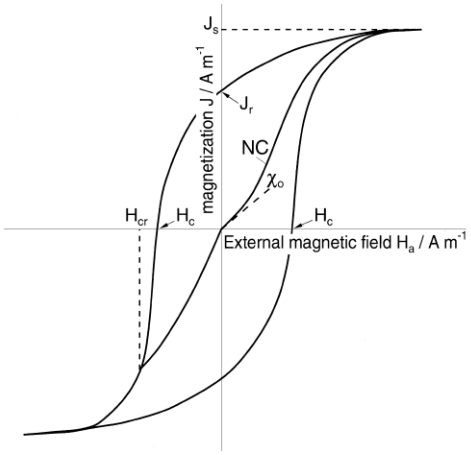


Figure 5 : Représentation schématique du cycle d'hystérésis

A mesure que le champ magnétique extérieur augmente, les parois de Bloch vont se déplacer progressivement conduisant ainsi à une orientation des moments magnétiques dans la direction du champ appliqué jusqu'à atteindre l'aimantation à saturation. Une diminution du champ magnétique conduit à des rotations des moments magnétiques vers les directions de facile aimantation se rapprochant de celle de H jusqu'à l'apparition des domaines magnétiques (Degauque J., 1992). Lorsqu'un champ magnétique de sens contraire est appliqué puis retiré, cela conduit à une annulation de la rémanence (Mr=0). Ce champ supérieur à Hc, correspond au champ coercitif de la rémanence (Hr). La pente de la courbe linéaire initiale M/H correspond à la susceptibilité magnétique initiale χ_0 (Cornell & Schwertmann, 2003). Il s'agit de l'aimantation observée à de faible champ (entre 50 et 100 µT).

Pour un matériau donné, les valeurs de Mr, Hc et Hr n'ont une signification intrinsèque que lorsque l'échantillon est aimanté jusqu'à la saturation (Degauque J., 1992). Ces grandeurs sont dépendantes de la température et diminuent lorsque l'on se rapproche du point de Curie (température au-dessus de laquelle un matériau ferrimagnétique devient paramagnétique). Elles dépendent également de la taille des grains et de l'état du domaine (Moskowitz B. M., 1991). Les anisotropies magnétiques peuvent agir fortement sur la forme du cycle d'hystérésis et affecter le champ coercitif et la rémanence.

2. Effet de la taille des nanoparticules sur les propriétés magnétiques

Lorsque les particules sont réduites à l'échelle nanométrique, leurs propriétés magnétiques changent par rapport à celles d'un matériau massif. Une diminution de la taille en dessous du diamètre critique d_c entraîne une augmentation de l'énergie de la paroi de Bloch par rapport à l'énergie dipolaire (Fig. 6). Ainsi la paroi ne peut plus se créer et les particules deviennent monodomaines (Degauque J., 1992). Le grain est alors uniformément magnétisé dans la direction de l'axe de facile aimantation et ne possède donc qu'un seul domaine (Moskowitz B. M., 1991). Les particules monodomaines ont un champ coercitif maximal par rapport aux grains plus gros.

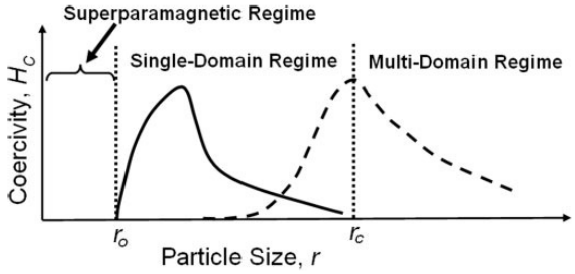


Figure 6 : Variation du champ coercitif en fonction du rayon r des nanoparticules (Jeong *et al.,* 2007)

Le diamètre critique se calcule selon l'expression suivante :

$$D_{MD} = 4\,\gamma / \mu_0\, N_{MD}\, M_s^2$$

N_{MD} : facteur démagnétisant pour un monodomaine

γ : énergie de la paroi

Pour la magnétite, la taille critique se situe aux environs de 30 nm (Zijlstra *et al.,* 1982 ; Brice-Profeta S., 2004). Une particule monodomaine possède une aimantation stable à température ambiante. On parle alors de nanoparticules monodomaines bloquées. Elles présentent alors un cycle d'hystéresis avec un champ coercitif et une rémanence.

Au dessus de la taille critique, les particules deviennent multidomaines et adoptent une configuration en plusieurs domaines. Une augmentation de la taille entraîne une diminution du champ coercitif et de la rémanence (Moskowitz B. M., 1991). Lorsque la taille des nanoparticules diminue en dessous de D_{MD} c'est-à-dire en dessous du monodomaine stable, il apparaît alors un comportement superparamagnétique. Les fluctuations thermiques deviennent plus importantes par rapport aux forces d'échanges et il s'effectue alors spontanément des retournements de l'aimantation (Degauque J., 1992). Ces particules ne présentent plus d'hystérésis et donc plus de champ coercitif ni de rémanence.

Le temps de retournement de l'aimantation s'appelle le temps de relaxation τ et dépend directement de l'importance de la barrière d'énergie (K_{eff} V) entre l'état de spin (up / down) et la température (kT) (Cornell & Schwertmann, 2003). La relation entre ces différents paramètres s'écrit de la façon suivante selon la loi de Néel-Brown (Cornell & Schwertmann, 2003) :

$$\tau = \exp \frac{(Keff.\ V)}{kT}$$

La valeur de la barrière d'énergie entre l'état "up/down" correspond au produit du volume de la particule (V) et de la constante d'anisotropie (K_{eff}) qui dépend de la taille des particules. k correspond à la constante de Boltzmann.

Les phénomènes de relaxation dépendent du temps de mesure (τ_m) (Cornell & Schwertmann, 2003) :

- Le moment magnétique d'une particule apparaît bloqué lorsque le temps de mesure est inférieur au temps de relaxation. Ce comportement peut être observé pour une température suffisamment basse ou pour des particules dont la taille est suffisamment élevée.

- Les moments magnétiques fluctuent en raison de l'agitation thermique lorsque le temps de mesure est supérieur au temps de relaxation. L'aimantation va alors apparaître nulle au temps des mesures. On observe ce comportement lorsque la température est suffisamment importante ou que la taille des particules est suffisamment faible.

L'énergie thermique des particules excède la barrière d'énergie d'activation entre les états de spin, ce qui conduit à des fluctuations spontanées entre les états de spin (relaxation superparamagnétique) (Cornell & Schwertmann, 2003). Ce retournement de spin induit une réduction ou une annulation du champ magnétique observé. La relaxation superparamagnétique est contrebalancée lorsque la température diminue et que le temps de retournement τ augmente. La température pour laquelle on observe un passage du régime superparamagnétique au régime bloqué correspond à la température de blocage T_B ($\tau = \tau_m$). En dessous de la température de blocage T_B, les particules superparamagnétiques ont un comportement ferromagnétique ou ferrimagnétique. La température de blocage peut être déterminée par la formule suivante :

$$T_B = \frac{K_{eff} \cdot V}{25\ k}$$

Lorsque la taille des nanoparticules diminue, il se produit une augmentation du rapport surface/volume, ce qui peut entraîner des effets de surface. Cette réduction de taille peut conduire à

une déviation de la direction des moments magnétiques des atomes situés en surface par rapport à ceux à l'intérieur de la particule. C'est ce que l'on appelle le « canting de spin » (Daou *et al.,* 2008 ; Roca *et al.,* 2009). Ce comportement entraîne une diminution de l'aimantation par rapport au matériau massif.

Les différents états monodomaines, pseudo-monodomaines, multidomaines et superparamagnétiques peuvent être déterminés grâce aux rapports Mr/Ms et Hr/Hc (cf. diagramme ci-dessous).

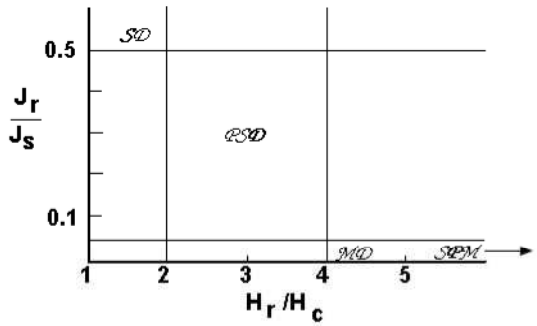


Figure 7 : Diagramme présentant les rapports Jr/Js et Hr/Hc (Day *et al.,* 1977)

L'état pseudo-monodomaine (PSD) correspond aux petits grains multidomaines montrant une forte rémanence comme pour les grains monodomaines et un faible champ coercitif comme pour les multidomaines (Moskowitz B. M., 1991). Dans le cas de la magnétite, le comportement pseudo-monodomaine se trouve pour des tailles comprises entre 0,1 et 20 µm.

La température de blocage peut être déterminée par des mesures d'aimantation en refroidissant l'échantillon en absence d'un champ (zero fied cooling) et en présence d'un champ (field cooling). Cette méthode permet d'obtenir des cycles d'aimantation.

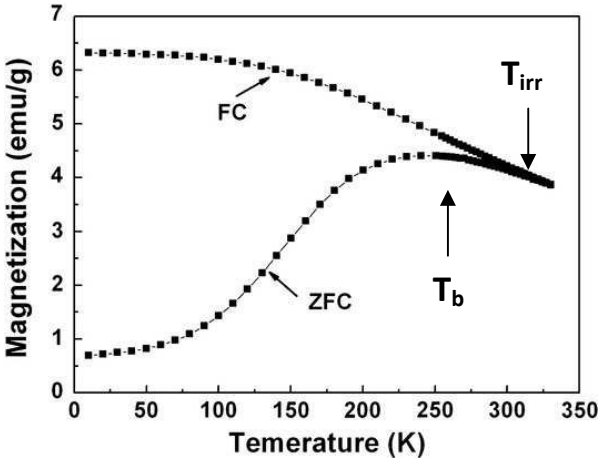


Figure 8 : Courbes Zero-Field-Cooled (ZFC) and Field-Cooled (FC) obtenues pour des nanoparticules CoFe2O4 sous un champ de 100 Oe (Li *et al.,* 2010)

Comme nous pouvons voir sur la figure 8, la température de blocage correspond au maximum de la courbe ZFC. En régime superparamagnétique, les courbes FC-ZFC se superposent. Au croisement des deux courbes, se trouve la température d'irréversibilité (T_{irr}). Pour des échantillons qui présentent une distribution de taille restreinte (monodisperse), la température d'irréversibilité est très proche de la température de blocage tandis que pour des nanoparticules polydisperses, T_{irr} est supérieure à T_b.

3. Interactions entre les nanoparticules

Les nanoparticules sont soumises aux interactions dipolaires qui tendent à refermer les lignes de flux magnétique. Ces interactions agissant à longues distances peuvent influencer les propriétés magnétiques des nanoparticules. L'énergie de l'interaction dipolaire s'exprime par la relation suivante (Hansen & Morup, 1998):

$$E_d \approx \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\mu^2}{d^3}$$

Pour un échantillon contenant des nanoparticules distribuées au hasard, μ correspond au moment magnétique moyen, d à la distance moyenne entre les nanoparticules et μ_0 à la perméabilité magnétique du vide.

Les interactions entre les nanoparticules peuvent varier en fonction de la concentration et vont induire un décalage de la température de blocage par rapport à des particules isolées (Morup *et al.,* 2010). Ce comportement est observé sur la courbe ZFC où l'aimantation maximale est obtenue à une température plus élevée lorsqu'il y a des interactions dipolaires. Les nanoparticules en suspension dans un liquide vont naturellement former une chaîne pouvant bouger librement sous l'application d'un champ magnétique extérieur. Lorsque la chaîne se forme, il apparaît alors un ordre ferromagnétique des moments magnétiques qui est favorisé en absence d'un champ magnétique. L'aimantation se trouve alors le long de la direction de la chaîne (Sugawara & Scheinfein 1997 ; Mørup S., 1987). Lorsque les nanoparticules sont soumises à de fortes interactions dipolaires, la relaxation superparamagnétique peut être supprimée. Toutefois, de faibles interactions dipolaires conduisent remarquablement à une relaxation plus rapide. Le schéma ci-dessous présente les différents types d'interactions (Fig. 9).

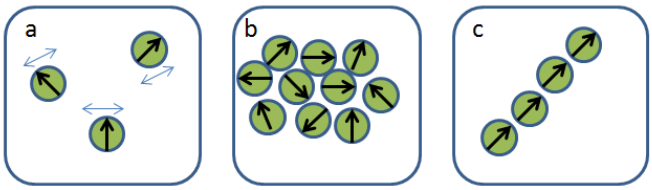


Figure 9 : (a) Nanoparticules isolées soumises à la relaxation superparamagnétique, (b) nanoparticules en interaction formant un « dipole glass » et (c) nanoparticules formant une chaîne où les moments sont alignés.

L'holographie électronique permet notamment d'obtenir des informations sur la direction de l'aimantation pour des nanoparticules individuelles lorsque celles-ci sont ferro- ou ferrimagnétiques en interaction.

Références bibliographiques

Brice-Profeta, S., 2004. Thèse de doctorat Université de Paris VI, Paris.

Daou T. J., 2007. Thèse de doctorat Université Louis Pasteur Strasbourg I, Strasbourg

Daou, T.J., Grenèche, J.M., Pourroy, G., Buathong, S., Derory, A., Ulhaq-Bouillet, C., Donnio, B., Guillon, D., Begin-Colin, S., 2008. Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. Chem. Mater. 20, 5869–5875.

Day, R., Fuller, M., Schmidt, V.A., 1977. Hysteresis properties of titanomagnetites: Grain-size and compositional dependence. Physics of the Earth and Planetary Interiors 13, 260–267.

Degauque J., 1992. Magnétisme et matériaux magnétiques : introduction. *Journal de Physique IV* 2.

Moskowitz, B. M., 1991, Hitchhiker's Guide to Magnetism, Environmental Magnetism Workshop, pp. 1–38, Minneapolis, The Institute for Rock Magnetism and the Global Paleorecords Research Training Group.

Cornell R. M., Schwertmann U., 2003. The Iron Oxides : Structure, Properties, Reactions, Occurences and Uses. WILEY-VCH, ISBN : 3-527-30274-3.

Hansen, M.F., Mørup, S., 1998. Models for the dynamics of interacting magnetic nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 184, L262–274.

Jeong U., Teng X. W., Wang Y., Yang H., Xia Y. N., 2007. Superparamagnetic colloids : controlled synthesis and niche applications. *Adv. Mater.* 19 (1), 33-60.

Li, X.-H., Xu, C.-L., Han, X.-H., Qiao, L., Wang, T., Li, F.-S., 2010. Synthesis and Magnetic Properties of Nearly Monodisperse CoFe2O4Nanoparticles Through a Simple Hydrothermal Condition. Nanoscale Res Lett 5, 1039–1044.

Morup, S., 1987. Mean field theory for interacting particles in a ferrofluid. Magnetics, IEEE Transactions on 3518 – 3519.

Morup, S., Hansen, M.F., Frandsen, C., 2010. Magnetic interactions between nanoparticles. Beilstein J Nanotechnol 1, 182–190.

Roca, A.G., Niznansky, D., Poltierova-Vejpravova, J., Bittova, B., González-Fernández, M.A., Serna, C.J., Morales, M.P., 2009. Magnetite nanoparticles with no surface spin canting. Journal of Applied Physics 105, 114309.

Sugawara, A., Scheinfein, M., 1997. Room-temperature dipole ferromagnetism in linear-self-assembling mesoscopic Fe particle arrays. Physical Review B 56, R8499–R8502.

Zijlstra H., 1982. Ferromagnetic Materials, North-Holland, Amsterdam. 3.

Résumé :

Ce travail de thèse constitue une nouvelle approche de l'étude du comportement des bactéries immobilisées dans des matrices inorganiques centrée sur l'influence d'un champ magnétique sur le comportement cellulaire. Des nouveaux gels incorporant des nanoparticules de magnétite ont été élaborés par voie sol-gel dans des conditions cytocompatibles et caractérisés par diffraction des rayons X, sorption d'azote, microscopie électronique en transmission (MET) et mesures magnétiques.

Après une étude de viabilité des bactéries modèles *Escherichia coli* immobilisées, le procédé d'encapsulation a été étendu aux bactéries magnétotactiques *Magnetospirillum magneticum*. L'effet d'un champ magnétique statique sur ces deux types de microorganismes a été étudié.

Enfin, les processus de biominéralisation intracellulaire chez les bactéries magnétotactiques ont été suivis en présence et en absence d'un champ magnétique statique sur des cellules immobilisées et en suspension. Cette approche nous a permis de comprendre les phénomènes liés à l'encapsulation et à l'exposition à un environnement magnétique extérieur. Des effets originaux du champ magnétique continu sur la cinétique de production des magnétosomes et sur la dynamique collective des chaînes de magnétosomes à l'intérieur des cellules encapsulées ont pu être mis en évidence.

Mots clés : sol-gel ; bio-encapsulation ; biominéralisation ; bactérie ; magnétite ; champ magnétique

Conception of nanostructured magnetic matrices for the study of intracellular mechanisms of biominéralisation

Abstract :

This work constitutes a new approach to the study of the behavior of immobilized bacteria in inorganic matrices focusing on the influence of a magnetic field on cell behavior. Novel gels incorporating magnetite nanoparticles were prepared by the sol-gel process in cytocompatible conditions and were characterized by X-ray diffraction, nitrogen sorption, transmission electron microscopy (TEM) and magnetic measurements.

After studying the viability of immobilized model bacteria *Escherichia coli*, the encapsulation process was extended to magnetotactic bacteria *Magnetospirillum magneticum*. The effect of a static magnetic field on these two types of microorganisms was studied.

Finally, the process of intracellular biomineralization in magnetotactic bacteria was followed in the presence and absence of a static magnetic field on the immobilized cells and suspension. This approach allowed us to understand the phenomena related to encapsulation and exposure to an external magnetic environment. New effects of the continuous magnetic field on the kinetics of magnetosome production and on the collective dynamic of magnetosome chains within the encapsulated cells are described.

Keywords : sol-gel ; bio-encapsulation ; biomineralization ; bacteria ; magnetite ; magnetic field