

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTES DES FIGURES	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XIII
INTRODUCTION GENERALE	1
I. THEORIE	3
I.1 Définition d'un biofilm	3
I.2 Structure d'un biofilm	3
I.2.1 La matrice extracellulaire polymérique	3
I.2.2 Les polysaccharides	4
I.2.3 Les protéines	4
I.2.4 Les acides nucléiques	5
I.3 Formation d'un biofilm	5
I.4 L'effet des biofilms sur le pH de leur environnement	6
I.5 La structure responsable de la résistance dans le biofilm	7
I.6 Le biofilm dans les écosystèmes naturels et leurs effets néfastes	7
I.7 Les techniques d'élimination des biofilms	9
I.7.1 Élimination de biofilms par le nettoyage mécanique	9
I.7.2 Élimination par les agents antibactériens	9
I.8 Les matériaux mésoporeux structurés	10
I.8.1 Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs)	10
I.8.2 La fonctionnalisation de la surface des MSNs	12
I.8.4 Le marquage des MSNs avec des fluorophores	12
I.8.6 Le déclenchement ciblé en fonction de la variation de pH	13

I.9 Dispositif microfluidique	14
I.10 Les avantages de dispositifs microfluidiques.....	14
I.10.1 Les faibles volumes	14
I.10.2 La taille de microcanaux	14
I.10.3 Les conditions hydrodynamiques précises	15
I.10.3.1 L'écoulement laminaire	15
I.10.3.2 Les forces de cisaillement	16
I.11 Fabrication des dispositifs microfluidiques	17
II. LES MATERIAUX ET APPAREILS UTILISES	18
II.1 Les nanoparticules type MCM-48.....	18
II.2 Les fluorophores	19
II.3 Les souches bactériennes, conditions de culture	20
II.4 Le dispositif microfluidique MF (matériels et équipements).....	20
II.5 Les accessoires microfluidique	20
II.6 Les matériels expérimentaux	21
II.6.1 Le microscope optique à lumière blanche	21
II.6.2 Le microscope optique à lumière fluorescente	21
II.6.3 Le microscope confocale à balayage laser (CLSM)	21
II.6.4 La Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)	22
II.7 Procédures expérimentales	23
II.7.1 La microfluidique	23
II.7.1.1 Conception géométrique du dispositif MF	23
II.7.1.2 Fabrication de moules par photolithographie	24
II.7.2 Fabrication du réacteur microfluidique	25
II.7.3 La culture du biofilm	26
II.7.4 Stratégies de fixation d'un dépôt de MSNs sur un microcanal MF	26
II.7.4.1 Les injections successives de suspension de NPS dans le microcanal	27
II.7.4.2 Dépôt par la technique « flow-deposition »	27
II.7.4.3 Test d'adhésion de dépôt et influence de flux hydrodynamique	29
II.7.5 Fixation du dépôt au milieu du microcanal MF ouvert par. Traitement par un surfactant anionique	31
II.7.6 Mesure des cinétiques de relargage aux différents débits par microscopie <i>in situ</i> ..	32

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	34
III.1 Solubilité de flourophore	34
III.2 Courbes de calibration.....	36
III.3 Mesure de la libération de fluorescéine dans les MSNs vide (sans fonctionnalisation)	37
III.4 Analyse de la libération de fluorescéine dans les MSNs vide (sans fonctionnalisation) avec des différents débits.....	41
III.5 Mesure de la libération de fluorescéinamine dans les MSNs avec fonctionnalisation avec un débit de 1 mL/h	42
III.5.1 Les MSNs sans fonctionnalisation	42
III.5.2 Les NPS MSN fonctionnalisés avec NH ₂ dans les pores	44
III.5.3 Les NPS MSN fonctionnalisés avec le phosphonates.....	45
III.5.4 Comparaison de la libération de la fluorescéine entre les MSNset NPs sans pores	48
III.5.5 Efficacité en fonction du temps	49
III.6 Les mesures de la couche des nano silice obtenues avec le microscope confocale CLSM	50
III.7 Vérification de la séchage total de MSNs après l'adsorption de fluorophore en utilisant la Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR)	52
III.8 Étude de biocompatibilité de dépôt MSNs et le biofilm	53
IV. CONCLUSION	56
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre quelques matériaux mésoporeux nanostructurés. [32]	11
Tableau 2 : Comparaison entre les objectifs de CLSM	22
Tableau 3 : Protocole expérimental de la solubilité de la fluorescéine aminée isomère I dans les différentes solutions tamponnées	34
Tableau 4 : Le point isoélectrique pour chaque molécule	48

Listes des figures

Figure 1 : La structure et la composition d'un biofilm [16].	4
Figure 2 : Cycle de développement simplifié d'un biofilm : (a) attachement, (b) attachement irréversible, (c) maturation I, (d) maturation II, (e) dispersion [22].	6
Figure 3 : (a) Variation de pH lors de la croissance d'un biofilm avec et sans glucose (vert et bleu, respectivement), (b) Les mesures ont été localisées dans le carré jaune [23].	7
Figure 4 : Les biofilms dans les environnements naturels et artificiels : (a) les systèmes de refroidissements (b) les canalisations (c) les systèmes de refroidissement (d) les surfaces submergés dans l'eau (e) la nature (f) environnement hydrothermal [29].	8
Figure 5 : La résistance d'un biofilm à l'addition l'antibiotique de l'extérieur [2].	10
Figure 6 : Une surface est recouverte de MSNs chargées d'espèces antimicrobiennes et permettant une réponse aux pH. (a) Une portion de la surface non revêtue de biofilm, est soumise à un pH élevé et séquestre les agents antimicrobiens. (b) Une portion de surface revêtue de biofilm est soumise à un pH acide et libère les agents antimicrobiens directement à l'intérieur du biofilm (flèches rouges).	10
Figure 7 : Représentation schématique de la structure de surface des pores pour (a) MCM-41 et (b) MCM-48 [34].	11
Figure 8 : Représentation schématique : (a) la post greffe, (b) bio fonctionnalisation avec la β -lactoglobuline, (c) la libération sensible au pH de b-droque/dye-MNPs [42].	13
Figure 9 : Micrographies optiques de microcanal comprenant : Deux circulations de flux laminaire chargé avec des débits (a) $Q_C = 0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et $Q_I = 0.3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et (b) $Q_C = 1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et $Q_I = 0.3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. La direction de l'écoulement pour Q_C et Q_I (a) et (b) est indiqué par la flèche. La barre d'échelle est la même pour (a) et (b) [52].	16
Figure 10 : (A) la variation du pH en fonction de temps dans des conditions d'écoulement $Q_1 = 0,1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $0 < t < 20 \text{ min}$; $Q_2 = 0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $20 < t < 60 \text{ min}$; $Q_3 = 0,3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $60 < t < 130 \text{ min}$; $Q_4 = 0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $130 < t < 185 \text{ min}$. Les lignes pointillées indiquent les moments où les conditions d'écoulement ont été changées. Les barres d'erreur ont été générées à partir de 4 zones de mesure distinctes.	17
Figure 11 : Des dispositifs microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS) [53].	18
Figure 12 : Schéma représentatif pour : (a) les MCM-48 vide, (b) après fonctionnalisation (c) avec le 3-(trihydroxysilyl) propyl methyl phosphonate monosodium, (d) (3-aminopropyl) triethoxysilane.	19
Figure 13 : Le spectromètre FTIR avec l'accessoire ATR diamant.	23
Figure 14 : Conception 3D du dispositif microfluidique (SolidWorks) du microcanal avec profondeur de $400 \mu\text{m}$ (couleur bleue), largeur 2 mm et longueur 36 mm.	23
Figure 15 : Étapes de fabrication d'un moule microfluidique par photolithographie.	24
Figure 16 : Les différentes étapes de fabrication du dispositif microfluidique	25
Figure 17 : Photos Obtenues au microscope sous lumières blanche (a) et polarisée (b) pour les suspensions sous forme de dépôt sur les murs de microcanal au milieu de	

microcanal en PDMS. Toutes les observations sont prises avec un objectif à grossissement 2x. Les barres d'échelle sont 1000 μm .	27
Figure 18 : Montage pour le dépôt d'une couche de NPS fait avec un débit.	28
Figure 19 : Surfaces obtenues au microscope sous lumières blanche et lumière polarisé : (a) et (d) au milieu du canal, (b) et (e) à l'entrée du canal avec un objectif 2x, (c) et (f) au milieu du canal avec un objectif 10x du dépôt formé par écoulement sur les murs de canal.	29
Figure 20 : (a) Les surfaces obtenues au microscope sous lumières blanches suite au test d'adhésion du dépôt sur le microcanal aux différents débits. La barre d'échelle est 1000 μm . (b) Mesure de la densité optique des surfaces obtenues (rectangle rouge zone de mesure de DO) suite au test d'adhésion en fonction de temps.	30
Figure 21 : Suspension de MSNs positionnée au milieu du microcanal en PDMS après un traitement par un liquide de la vaisselle (#MS0500424, Canada).	31
Figure 22 : Étapes d'élaboration d'un dépôt de NPs : (a) injection de la suspension de MSNs dans le milieu de canal ouvert, (b) séchage, (c) fermeture de demi-canal par plasma.	32
Figure 23 : Dépôt de MSNs au milieu du microcanal observé sous la lumière blanche.	32
Figure 24 : Injection d'une quantité de fluorescéine sur le dépôt de NPs.	33
Figure 25 : Montage pour la surveillance du relargage de la fluorescéine des MSNs.	33
Figure 26 : La variation de la solubilité de fluorescéinamine dans les différentes solutions tamponnées.	35
Figure 27 : La variation de la solubilité de fluorescéinamine avec une concentration 0.457 μM dans les différentes solutions tampons en fonction de l'intensité de la lumière fluorescente. Barres d'erreurs (plus petites que les marqueurs) étaient fait par l'écarte-type de trois mesures séparées.	35
Figure 28 : L'intensité de la lumière (I) en fonction de la concentration des molécules (a) fluorescéine et (b) fluorescéinamine. Chaque courbe était obtenue au pH=7 et avec les mêmes paramètres d'acquisition (gaine 10 et temps d'exposition de 500 ms).	36
Figure 29 : Photos microscopiques du premier dispositif MF lors du premier lavage pour la fluorescéine (rectangle jaune: zone de mesure de l'intensité fluorescente).	37
Figure 30 : Évolution de l'intensité de la lumière émis de la fluorescéine au cours du temps. La ligne verticale montre le temps où le débit a changé de 1 mL/h à 2 mL/h.	37
Figure 31 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente au cours du temps normalisé (basé sur les mêmes données dans figure 30).	38
Figure 32 : Variation de l'intensité de la lumière fluorescente correspondante aux trois lavages consécutifs en fonction du temps pour la fluorescéine.	39
Figure 33 : Photo obtenue sous lumière fluorescente correspondant au troisième lavage de MSNs de la figure 32. La boîte rouge représente la zone de mesure de l'intensité fluorescente.	39

Figure 34 : (a) Force de cisaillement et (b) profil d'intensité en fonction de la position le long de la section transversale du canal. En tout cas, the canal était le meme $h=400 \mu\text{m}$, $w=2000 \mu\text{m}$ avec un débit de liquide appliqué, $Q=1 \text{ mL/s}$.	40
Figure 35 : Variation de l'intensité de la lumière en fonction de la force de cisaillement.	41
Figure 36 : Évolution de la concentration de la fluorescéine au cours du temps pour chaque débit.	42
Figure 37 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéinamine) au cours du temps pour chaque solution tampon.	43
Figure 38 : La variation de l'intensité maximal en fonction pH pour les MSNs non-fonctionnalisées et fluorescéinamine. Barres d'erreurs (plus petites que les marqueurs) étaient fait par l'écarte-type de trois mesures séparées.	44
Figure 39 : (a) Le groupement fonctionnel NH_2 se trouve dans les pores de MSN et (b) la variation de maximum de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéinamine) en fonction pH.	44
Figure 40 : (a) Le groupement fonctionnel le phosphonate se trouve dans les pores et sur la surface MSNs et (b) évolution de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéinamine) au cours du temps pour chaque solution tampon.	45
Figure 41 : La variation de maximum de l'intensité de la lumière fluorescente en fonction pH.	46
Figure 42 : La variation de potentiel Zeta en fonction de pH.	46
Figure 43 : (1) fluorescéinamine, isomère I (2) la silice (3) (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) à $\text{pKa}=8$ (4) 3(Trihydroxysilyl) propyl méthyl phosphonate monosodium salt solution 50% wt in H_2O à $\text{pKa}=2$.	47
Figure 44 : Comparaison de la variation de l'intensité de la lumière en fonction de temps pour les NPS. La figure agrandie montre la libération initiale des molécules non-liées au MNS. Débit était $Q = 2 \text{ mL/h}$ avec une solution tamponnée à pH 7.	49
Figure 45 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente en fonction du temps pour 4 expériences avec un déclenchement de libération avec une solution tamponné initialement à pH 7 et après pH 4 aux différents temps. La figure agrandie montre la libération initiale des molécules non-liées au MSNs. $Q_{\text{initial}} = 2 \text{ mL/h}$ pour tout, et a devenu à $Q_{\text{final}} = 0,5 \text{ mL/h}$ a peu près 2000-3000 s.	50
Figure 46 : (a) Image typique d'une coupe transversale de la couche de NPs (sans pores) contenant fluorescéine par CLSM. (b) Mesure d'intensité de fluorescence émis par le dépôt en fonction de la distance verticale par CLSM en direction de la flèche bleue dans le micro canal. La largeur de la boîte jaune montre l'épaisseur du dépôt.	51
Figure 47 : Photos obtenues au CLSM de NPs avec pores (a, b) et sans pores (c, d) avec un objectif 4x (résolution-Z = $54 \mu\text{m}$) (a,c) et objectif 10x (résolution-Z = $8.55 \mu\text{m}$) (b,d). Les deux rectangles (bleu et rouge) marquent la zone où l'épaisseur a été mesurée. (e) Le profil d'intensité suivant l'axe z pour des couches composée par NPs non-poreux	

(rouge) et des couches composées par NPs poreux (bleu). Les flèches présentent la distance entre la couche supérieure et inférieure.....	52
Figure 48 : Evolution des spectres d'absorbance vibrationnelle avec le temps de séchage pour les MSNs fonctionnalisées par le phosphonate (MSNs-P, bleu) et les MSNs fonctionnalisées par le phosphonate avec la fluorescéineamine (MSNs-P-fluo). Temps de séchage est indiqué. Dans tous les cas, les MSNs étaient dispersé dans le une solution aqueuse (pH 8).	53
Figure 49 : Des images microscopiques de croissance d'un biofilm au cours de temps (a) 0 h, (b) 43 h, (c) 76 h, (d) 81 h, (e) 93 h et (f) 116 h. (g) La densité optique mesurée dans le canal vide sans dépôt de NPS (rectangle bleu) et dans le dépôt de NPS (rectangle rouge) pour suivre la croissance de biofilm avec un débit $Q = 0,4 \text{ mL.h}^{-1}$	54
Figure 50 : Variation d'intensité de fluorescence de la fluorescéineamine en fonction de temps de croissance de biofilm suite à un changement de medium LB sans glucose à un LB avec glucose durant 6 jours.	55

Liste des abréviations

MSNs Nanoparticule de silice mésoporeuse

MCM-48 Mobil Composition of Matter (canaux cubique interconnectés)

MCM-41 Mobil Composition of Matter (porosité hexagonale)

FITC Isothiocyanate de fluorescéine

EPS Matrice extracellulaire polymérique

PDMS Polydiméthylsiloxane

MF Microfluidique

CLSM Microscope confocal à balayage laser

NPs Nanoparticule de silice

MSNs-P Nanoparticule de silice mésoporeuse fonctionnalisée avec le phosphonate

TPM Tours par minute

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Prof. Jesse Greener pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et m'avoir permis de travailler dans un milieu de travail très enrichissant. S'il n'avait pas cru en moi en m'offrant mon premier stage de PFE, je n'aurais sans doute pas pu avoir un cheminement d'étude aussi prometteur. Par ses conseils, ses critiques constrictives et son soutien moral et financier, Prof. Greener m'a permis d'acquérir de solides expériences et des compétences nécessaires pour effectuer ce travail. Ce qui a rendu le travail de plus en plus agréable. De plus, son expertise et ses connaissances dans plusieurs domaines à savoir la chimie, la biologie, la micro-fabrication, la spectroscopie et la microscopie m'ont été d'une grande aide tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier aussi Prof. Fredy Kleitz pour sa collaboration et sa contribution, sa disponibilité, son dynamisme et ses sages conseils scientifiques qui m'ont aidée dans la suite de mes travaux dans ce projet. Un grand merci aussi à son étudiante en doctorat Meryem Bouchoucha.

J'aimerais remercier mes collègues du laboratoire pour m'avoir accompagnée tout au long de ce parcours. Leur aide, leur appui, leur travail et leur bonne humeur m'ont permis d'avancer et de passer de merveilleuses journées au laboratoire spécialement Mirpouyan Zarabadi, Mazeyar Gashti, Pousti Mohammad, Arnaud Reitz François Paquet-Mercier, Farnaz Asayesh et Mehran Abbaszadeh.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien quotidien. Grand merci à mon père en témoignage de mon amour et de mon profond respect. Merci pour son soutien sans limites, sa patience et ses sacrifices ; Merci d'être aussi exceptionnel. J'espère que tu trouveras dans ce travail l'expression de ma grande et profonde estime. Je remercie ma mère pour ses sacrifices déployés à mon égard. Merci d'être aussi patiente, aussi aimante et aussi unique. Je lui dois énormément pour la réalisation de ce projet.

Introduction générale

Les biofilms sont difficiles à éradiquer. La prévention est la stratégie optimale pour leur contrôle. Bien que l'élimination du biofilm peut se produire naturellement par des processus intrinsèques [6], l'enlèvement mécanique est une commune stratégie dans l'industrie alimentaire. Cependant, cette solution s'avère très coûteuse d'un point de vue argent et temps. Concernant l'application des molécules antibactériennes, les biofilms ont une diversité de mécanismes de défense grâce à leur matrice extracellulaire polymérique (EPS). Par rapport à leurs équivalents planctoniques, les cellules de biofilms sont 10-1000 fois plus résistantes[2]. La façon dont les micro-organismes développent une résistance est complexe. Certains mécanismes impliquent une retardation de diffusion des molécules antimicrobienne et de leur inactivation par des enzymes naturelles dans l'EPS.

Ce projet cible l'étude de revêtements nanoporeux sensibles au pH [8], conçus à base de nanoparticules de silice fonctionnalisées, et leurs interactions avec un biofilm. Des particules de silice mésoporeuses de dimension nanométrique sont assemblées en couche sur un substrat, puis chargées en espèces antimicrobiennes libérables en présence d'un pH acide. La diffusion des espèces sous une stimulation acide sera suivie par microscopie. La silice est généralement considérée, de nos jours, dans plusieurs applications biomédicales comme des matériaux prometteurs pour la libération de médicaments en particulier à des populations de cellules. La taille, la structure et la chimie de ces matériaux biocompatibles peuvent être contrôlées avec précision [9]. En particulier, les MSNs ont été explorés en tant que systèmes de délivrance de médicaments potentiels pour une variété d'agents thérapeutiques. Par exemple, ils sont très utilisés pour le revêtement de surface de matériaux inorganiques afin d'assurer leur application biologique en améliorant leur biocompatibilité comparativement à leurs homologues organiques ou polymères. Les vecteurs de délivrance de médicaments à base de matériaux inorganiques poreux pourraient fournir une résistance mécanique prolongée, une stabilité chimique, une biocompatibilité et une résistance à l'attaque microbienne [10]. Pour l'administration des médicaments, les MSNs peuvent être considérés comme des candidats idéaux en raison de leurs caractéristiques uniques.

Dans le but d'avoir des vecteurs d'agents antibactériens plus efficaces et d'obtenir plus d'information sur le relargage des molécules antibactériennes, nous avons choisi d'initier une étude portant sur l'utilisation d'un nouveau vecteur de molécules bioactives : les nanoparticules de silice méso-poreuse de type MCM-48 (taille des pores de l'ordre de 3-4 nm) [11]. Ces matrices se caractérisent par une capacité d'adsorption plus élevée que celle des MCM-41 (les plus étudiés dans la littérature). Cette approche permettrait de piéger et de délivrer des quantités plus élevées d'agents antibactériens. Ces nanoparticules permettraient d'introduire des fluorophores (exemple : FITC la fluorescéine) dans leurs pores, pour le suivi de la livraison des nanoparticules et du relargage (désorption) *in-vivo* [12].

Les principaux objectifs de notre étude sont :

- Déposer une surface antisalissure dans le canal microfluidique à base de nanoparticules de silice mésoporeuse de type MCM-48.
- Incorporer un modèle de médicament dans un NPS bien fonctionnalisé pour rendre leur libération sensible au pH.
- Contrôler les forces de cisaillements par l'utilisation d'un dispositif microfluidique et bien comprendre ses effets sur la libération des modèles de médicaments.
- Libérer des agents antimicrobiens sur demande lors de la croissance d'un biofilm sur une couche de silice.

I. Théorie

Dans cette partie, nous allons présenter les biofilms qui vont constituer le support de notre étude. Parmi les exigences fixées au niveau de cette étude pour l'élaboration d'un biofilm, celui-ci doit être résistant aux agents antimicrobiens. De plus, les nanoparticules de silice MSNs, qui vont être disposées comme revêtement de la surface du biofilm dans le dispositif microfluidique doivent assurer la croissance du biofilm, le revêtement à base de MSNs et la simulation de la désorption tout en respectant la biocompatibilité entre tous les composants du système à réaliser.

I.1 Définition d'un biofilm

Un biofilm est composé d'agrégats de microorganismes sessiles. Il est caractérisé par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, à une interface ou entre elles et enrobées d'une substance extracellulaire polymérique que ces cellules ont produite

I.2 Structure d'un biofilm

I.2.1 La matrice extracellulaire polymérique

La matrice extracellulaire polymérique est une composante responsable dans la résistance d'un biofilm [14].

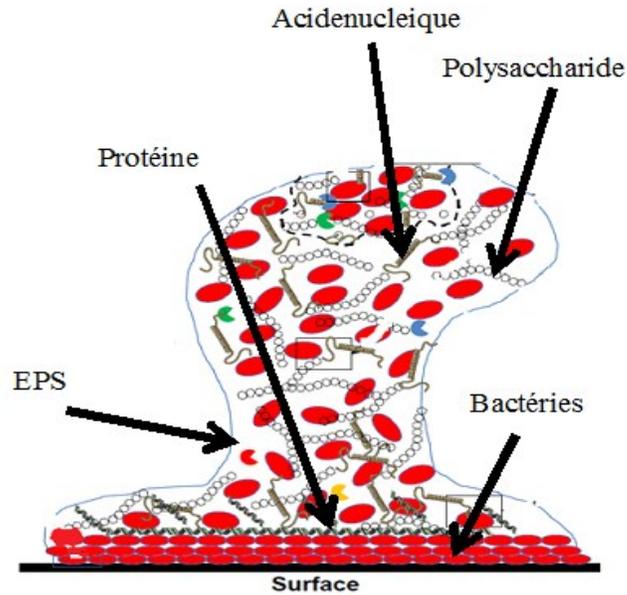


Figure 1 : La structure et la composition d'un biofilm [16].

Généralement, la matrice extracellulaire, appelée exopolymères bactériens (EPS), est constituée par des polymères excrétés par les bactéries, tel que des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques extracellulaires (Figure 1) [15].

I.2.2 Les polysaccharides

Les polysaccharides extracellulaires sont fortement liés à la paroi bactérienne pour le maintien de la cohésion structurale des biofilms. Par exemple, des bactéries planctoniques produisent les polysaccharides pour faire une couche de conditionnement initiale sur les surfaces proches. Après une accumulation suffisante, la couche de polysaccharide aide l'adhésion des bactéries planctoniques et leur transition à la vie collée (sessile). De plus, les polysaccharides sont nécessaires pour que les bactéries restent collées aux autres composants dans l'EPS. Par conséquent, le biofilm sera plus épais. Un biofilm plus épais (vieux) aura une plus grande concentration de polysaccharides à la surface au détriment d'une moins grande vers l'extérieur à cause des différences d'âge des biofilms dans les deux endroits.

I.2.3 Les protéines

Les protéines se trouvent dans la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle primordial dans la communication entre les cellules. Elles produisent la cellulose au sein du biofilm[17].

Plusieurs enzymes se sont montrées efficaces à dégrader la matrice polymérique du biofilm. Par exemple, l'alginate lyase est capable de dégrader l'alginate contenue dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa*.

I.2.4 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques se présentent aussi dans la matrice extracellulaire. Ils sont produit lors de la lyse des cellules ou par l'intermédiaire de vésicules membranaires [18]. Ils jouent un rôle important dans l'architecture et la stabilité du biofilm. En effet, ils permettent de créer une barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens.

I.3 Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm représente un changement fondamental dans le mode de vie des bactéries. Cette transition correspond au passage d'un mode de vie planctonique et individuel à un mode de vie communautaire et sessile. C'est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des micro-organismes concernés [19]. Par conséquent, les mêmes individus ne possèdent plus les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions.

L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente de lorsqu'elles sont sous forme planctonique dans un milieu liquide, fluide ou même solide. Ainsi, les bactéries vivant en biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. Il faut noter que dans la littérature, les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie commencent tout juste à être identifiés et étudiés.

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (figure 2). Premièrement, les bactéries font un attachement préliminaire à une surface. Deuxièmement, ces bactéries adhèrent et s'attachent spécifiquement et irréversiblement à une surface (adhésion). Troisièmement, les cellules bactériennes s'agglutinent, se multiplient et forment des microcolonies (maturation I). Quatrièmement, lors de l'étape de maturation II du biofilm, un certain nombre de cellules retournent à l'état planctonique. La dernière étape de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes [20].

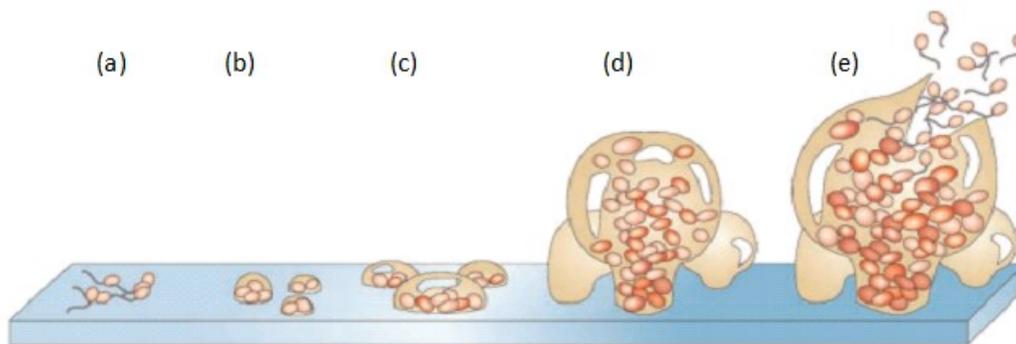


Figure 2 : Cycle de développement simplifié d'un biofilm : (a) attachement, (b) attachement irréversible, (c) maturation I, (d) maturation II, (e) dispersion [22].

Malgré l'acceptation du modèle de formation du biofilm en figure 2, récemment, il a été énoncé dans la littérature, que la phase de dispersion n'est pas uniquement à la fin du cycle. En effet, la prolifération des bactéries planctonique est continue et indépendante du débit de liquide autour du biofilm [21].

I.4 L'effet des biofilms sur le pH de leur environnement

Les biofilms ont des compositions hétérogènes de microbes et sont connus pour leur influence sur la chimie de leur environnement et spécifiquement dans le maintien de l'équilibre du pH. Leur intérêt pour la science de l'environnement, la médecine et la biocatalyse est bien établi, Leur sensibilité et leur réactivité à différents environnements hydrodynamiques a récemment commencé à attirer plus l'attention des chercheurs en microfluidique. Comme par exemple, le biofilm oral de bactérie type *Streptococcus salivarius* est connu par le changement du pH dans les bouches des mammifères. Lorsque cultivés dans un milieu enrichi en glucose dans un dispositif microfluidique, il est noté que le pH à proximité du biofilm varie rapidement lorsque la concentration du glucose dans la phase liquide augmente ou diminue (figure 3).

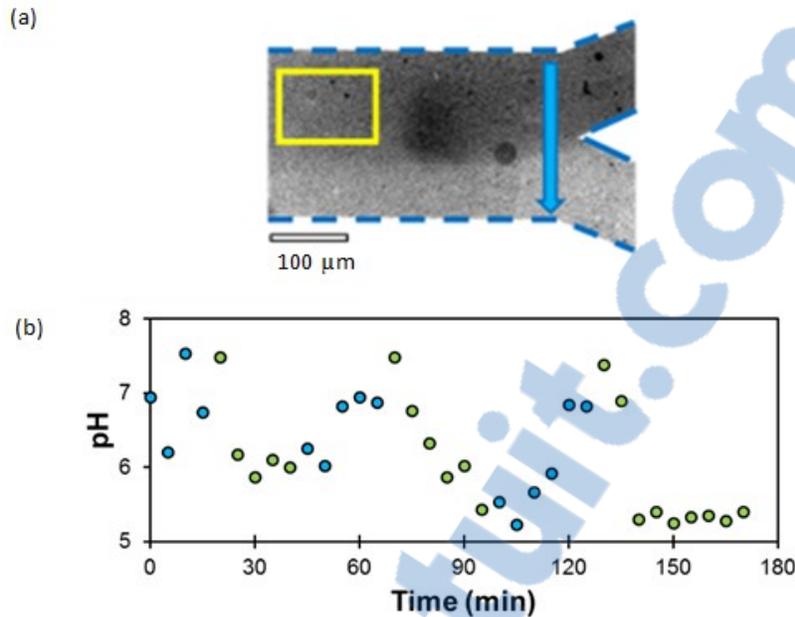


Figure 3 : (a) Variation de pH lors de la croissance d'un biofilm avec et sans glucose (vert et bleu, respectivement), (b) Les mesures ont été localisées dans le carré jaune [23].

I.5 La structure responsable de la résistance dans le biofilm

Les biofilms présentent une fonction primaire qui est la protection. Plusieurs études ont été réalisées pour examiner la diffusion des antibiotiques par les biofilms et elles ont montré que la matrice extracellulaire peut agir comme une barrière limitant la pénétration des composants antimicrobiens [2]. En effet, lors du traitement antibiotique les cellules près de l'interface liquide du biofilm meurent, tandis que les cellules bactériennes intégrées profondément à l'intérieur du biofilm sont capables de survivre. Un des facteurs expliquant cette résistance des biofilms aux agents antimicrobiens est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens [24].

I.6 Les biofilms dans les écosystèmes naturels et leurs effets néfastes

Les avancées scientifiques dans le domaine de la microbiologie ont montré l'existence de biofilms bactériens dans des écosystèmes naturels à savoir le fond des océans, les fleuves, les lacs, les tissus vivants, ou même encore dans l'air atmosphérique [25]. Ces biofilms sont responsables de nombreux problèmes de santé publique. Ils représentent une source de

contaminations et se manifestent dans un grand nombre de secteurs. Les secteurs hospitaliers, médicaux et agroalimentaires sont particulièrement les plus touchés. Par exemples, La contamination des canalisations des réseaux d'eau potable, des instruments chirurgicaux (cathéters, implants, prothèses, endoscopes) [26][27] et des appareillages utilisés dans l'agroalimentaire (laiteries, planches de découpe de viande) [28] font partie des problèmes rencontrés. La formation de biofilms sur les coques de navires, appelé phénomène de « biofouling » [1], conduit à une augmentation de résistance hydrodynamique, une diminution de la vitesse des bateaux et par conséquent des coûts énergétiques considérables. Enfin, des biofilms se manifestent dans tous les environnements et sont associés à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces dentaires).

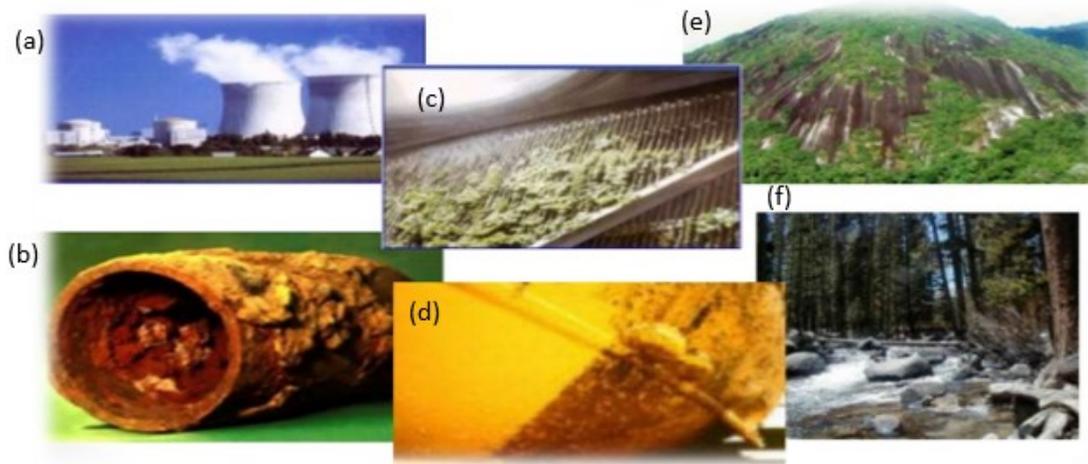


Figure 4 : Les biofilms dans les environnements naturels et artificiels : (a) les systèmes de refroidissements (b) les canalisations (c) les systèmes de refroidissement (d) les surfaces submergées dans l'eau (e) la nature (f) environnement hydrothermal [29].

Les biofilms sont une cause majeure d'infections humaine. En effet, la majorité des infections nosocomiales sont dues à des biofilms, car ils peuvent être colonisateurs de dispositifs biomédicaux [26]. Une grande proportion des infections nosocomiales sont liées à la colonisation d'agents pathogènes sur la surface de dispositifs médicaux implantés tels que des respirateurs, des cathéters (veineux central, urinaire), prothèses de valves cardiaques et les appareils orthopédiques. Un cas pareil a eu lieu dans un bâtiment sur la rue St-Joseph dans la ville de Québec en juillet 2012 : c'était une légionellose provoquée par une bactérie qui a attaqué une tour de refroidissement. Depuis le début de l'épidémie, 180 cas ont été signalés et 13 personnes en sont mortes.

I.7 Les techniques d'élimination des biofilms

Les techniques d'élimination des biofilms peuvent se présenter selon deux axes principaux : un axe préventif pour éviter la formation des biofilms et un axe curatif pour les détruire lorsqu'ils sont formés.

I.7.1 Élimination de biofilms par le nettoyage mécanique

Cette méthode consiste à appliquer des forces de cisaillement importantes. Elle permet d'éliminer en nettoyant les micro-organismes de leur support. Le nettoyage consiste à exécuter des cycles alternés en utilisant des solutions détergentes et des désinfectantes, suivie d'un rinçage par l'eau [6]. Des turbulences et des vitesses d'écoulement très élevées de l'eau peuvent détruire les bactéries du biofilm. Cette méthode utilise habituellement des acides caustiques, des tensioactifs, des biocides et parfois des enzymes. Un plan de nettoyage inefficace conduit à des coûts d'exploitation et d'entretien causés par le temps d'arrêt de la production et/ou par la perte des produits contaminés.

La majorité des désinfectants ne peuvent pas entrer au sein des biofilms, et certaines bactéries sont résistantes à leur opération, ce qui rend ces méthodes de nettoyage inefficace [2]. De plus, ce type de méthodes ne peut être appliqué pour les humains puisque les désinfectants utilisés sont en majorité toxique pour l'être humain.

I.7.2 Élimination par les agents antibactériens

Les bactéries montrent une résistance profonde, rendant ainsi les cellules du biofilm de 10 à 1000 fois moins sensibles à divers agents antimicrobiens. L'activité métabolique réduite d'un certain nombre de bactéries dans les biofilms pourrait expliquer leur résistance accrue à un traitement aux antibiotiques [30]. L'élimination partielle de bactéries dans les biofilms par des antibiotiques peuvent être expliquées par ce type de résistance. La figure 5 montre que les bactéries des biofilms traitées avec des antibiotiques peuvent potentiellement être éliminées sur la périphérie [31], tandis que celles en profondeur persistent et forment un nouveau noyau. Les cellules à l'interface du biofilm sont rapidement tuées, tandis que celles profondément à l'intérieur restent actives.

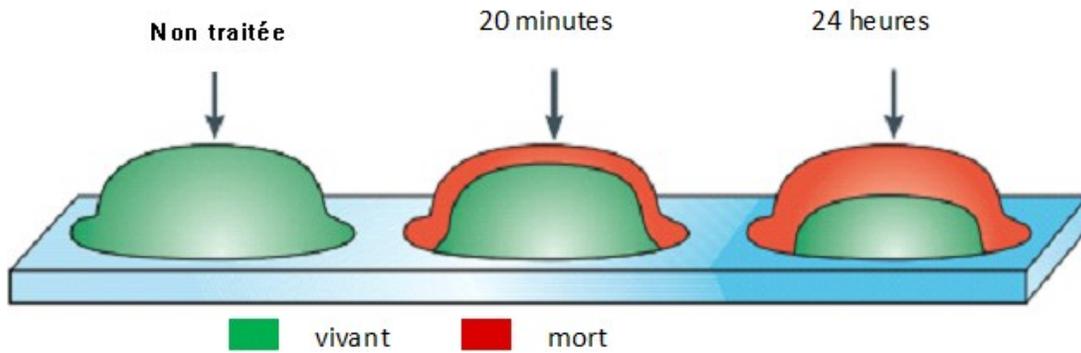


Figure 5 : La résistance d'un biofilm à l'addition l'antibiotique de l'extérieur [2].

Nous proposons de développer une surface sous forme de revêtement qui libère sur demande des agents antimicrobiens en présence d'un biofilm qui diminue le pH local. Cette méthode pourrait assurer une meilleure efficacité. Pour ce faire, nous envisageons l'utilisation de couches des nano particules de silice mésoporeuses comme agents de diffusion d'agents antimicrobiens (figure 6).

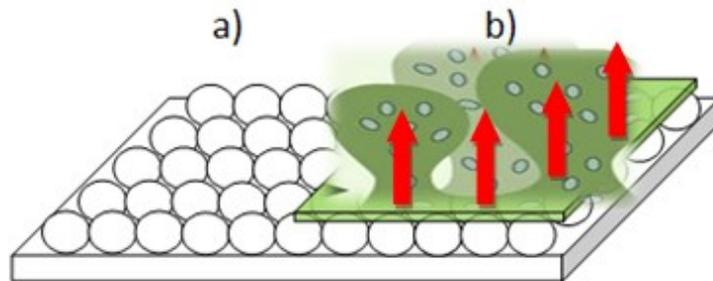


Figure 6 : Une surface est recouverte de MSNs chargées d'espèces antimicrobiennes et permettant une réponse aux pH. (a) Une portion de la surface non revêtue de biofilm, est soumise à un pH élevé et séquestre les agents antimicrobiens. (b) Une portion de surface revêtue de biofilm est soumise à un pH acide et libère les agents antimicrobiens directement à l'intérieur du biofilm (flèches rouges).

I.8 Les matériaux mésoporeux structurés

I.8.1 Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs)

Les matériaux poreux sont catégorisés selon la taille de leur pore. Par exemple les nanoparticules de silice mésoporeuses sont des matériaux ayant un diamètre moyen des pores entre 2 et 50 nm. Le terme « nano » est relié à la taille nanométrique de ces particules.

Beaucoup de types de matériaux mésoporeux nanostructurés sont cités dans la littérature [9]. Les plus communs sont les M41S et le terme générique pour les différents types de matériaux est MCM (Mobil Composition of Matter). Cette famille comporte les matériaux de type MCM-41 ayant une structure de porosité hexagonale (structure 2D) et les matériaux de type MCM-48 qui possèdent une structure de canaux cubiques qui sont interconnectés et organisés selon une symétrie cubique (structure 3D) [32] (figure 7).

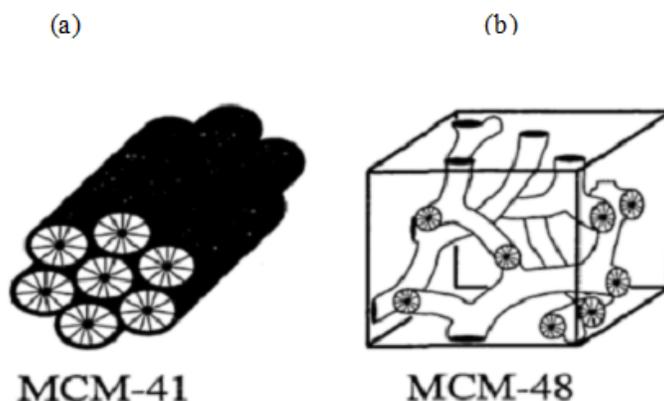


Figure 7 : Représentation schématique de la structure de surface des pores pour (a) MCM-41 et (b) MCM-48 [34].

Les SBA (Santa Barbara Amorphous) et les MSU (Michigan State University) représentent d'autres familles de matériaux. Ces derniers se différencient par leurs conditions de synthèse (alcaline, acide ou neutre) et par le type de l'agent structurant utilisé (ionique ou non-ionique) (Tableau 1). Les nanoparticules possèdent des propriétés spécifiques et une fonctionnalisation avec des molécules variées.

Tableau 1 : Comparaison entre quelques matériaux mésoporeux nanostructurés [32].

Matériaux mésoporeux	Structure mésoporeuse	Taille des pores
MCM-41, MCM-48	Hexagonale 2D, cubique 3D, lamellaire	2 – 10 nm
SBA-15, SBA-1, SBA-2	Hexagonale 2D, cubique 3D, lamellaire	4 – 14 nm
MSU-2, MSU-3	Hexagonale 2D	2 – 6 nm

Dans ce travail, nous nous intéressons aux nanoparticules de silice mésoporeuses de type MCM-48 appartenant à la famille des M41S, puisque ce matériau possède des matrices qui ont des avantages en termes de transport et de diffusion de matière [33]. Cela les rend très intéressants pour la diffusion des médicaments (figure 7).

I.8.2 La fonctionnalisation de la surface des MSNs

La fonctionnalisation consiste à introduire des groupements amines et des phosphonates qui sont sensibles au pH acide entre 4 et 7 [34], [9]. La procédure de greffe a été réalisée en solution aqueuse tel que rapporté dans la littérature. En effet, une solution de THMP (molécules des phosphonates de silane) acide a été préparée en ajustant le pH de THMP à une valeur comprise entre 5 et 6.

I.8.3 Le rôle biologique des nanoparticules de silice mésoporeuses

Les MSNs sont des prétendants potentiels pour des applications dans des domaines très variés tels que les applications médicales, les applications en imagerie et aussi en thérapie en les utilisant comme des intermédiaires de vectorisation.

I.8.4 Le marquage des MSNs avec des fluorophores

La microscopie à fluorescence conventionnelle et la microscopie confocale sont les procédés principaux de l'imagerie optique. L'imagerie optique de fluorescence est basée sur la fluorescence des tissus ou sur celle des fluorophores. Cette technique est très utilisée pour l'étude cellulaire et les essais *in vitro*. Les colorants fluorescents et les points quantiques (quantum dots) sont les sondes d'imagerie optique de fluorescence les plus utilisés. Dans la littérature, le marquage des nanoparticules de silice mésoporeuses est généralement élaboré par greffage [38] (au niveau de la surface interne) de colorants fluorescents (l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la rhodamine B, l'alexa fluor 750, le vert d'idocyanine et le colorant rouge) [39]. Ces colorants sont des molécules organiques, appelées fluorochromes, qui se caractérisent par la présence de groupements chromophores capables d'émettre une lumière fluorescente suite à leur excitation à une certaine longueur d'onde.

I.8.6 Le déclenchement ciblé en fonction de la variation de pH

Le pH est l'une des commandes biologiques les plus convenablement utilisées pour déclencher la libération du médicament [40]. Au cours des dernières années, beaucoup de systèmes réactifs, sensibles au pH, sont utilisés pour le contrôle de la libération à travers MSNs. Ils ont été mis au point pour libérer divers types des molécules comme les médicaments [41]. Dans la figure 8, NPS MCM-48 est fonctionnalisé avec 3-amino propyl triéthoxysilane (APTES). Il contient des groupements chimiques $-NH_2$ qui sont responsables de la protonation et de la déprotonation suite à un changement de pH. Ces particules ont ensuite été chargées avec un médicament de modèle de l'ibuprofène (IBU) ou acridine (ACR). À un pH inférieur à 5, la β -lactoglobuline succinylée subit un processus de gélification qui a un impact sur sa structure secondaire. Le gel empêche alors la libération du médicament. À un pH supérieur à 5, la β -lactoglobuline est devenue perméable, permettant ainsi le médicament de diffuser à l'extérieur.

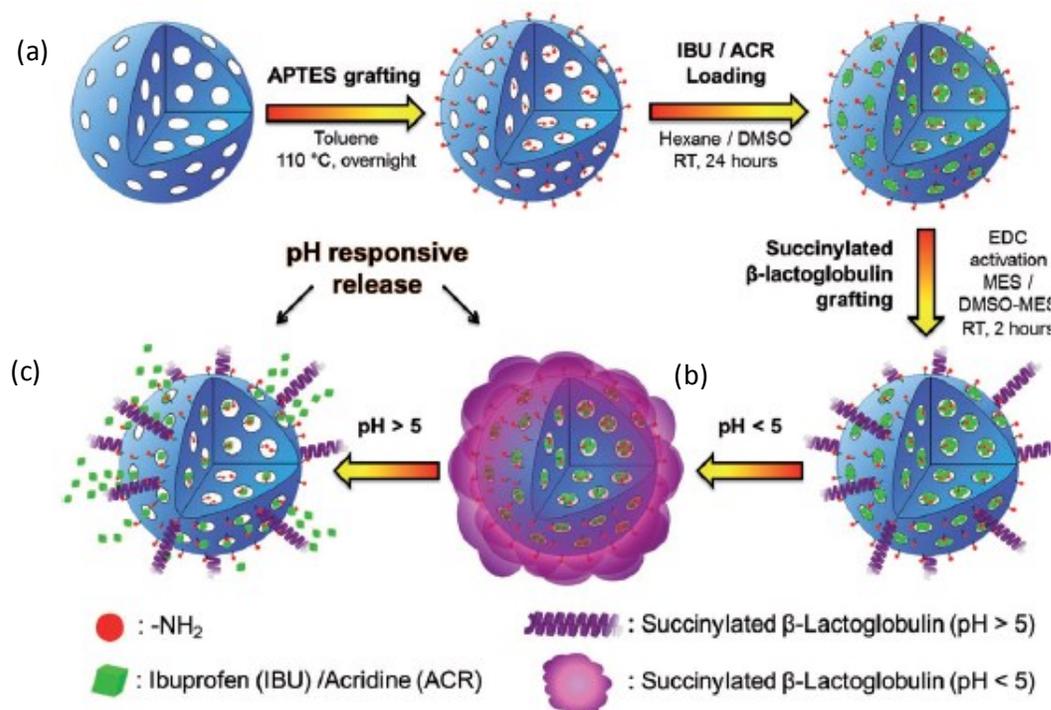


Figure 8 : Représentation schématique :(a) la post greffe, (b) bio fonctionnalisation avec la β -lactoglobuline, (c) la libération sensible au pH de b-droque/dye-MNPs [42].

I.9 Dispositif microfluidique

La microfluidique est la science qui traite le contrôle et la manipulation de liquide dans les canaux avec, au moins une dimension inférieure à 1000 μm . Les dispositifs microfluidiques présentent une plateforme prometteuse pour les études de biofilms bactériens parce qu'ils fournissent un système fermé dans lequel les biofilms bactériens peuvent interagir avec les environnements hydrodynamiques. Le fluide qui circule dans ces dispositifs est très stable et le rendement de réponse est rapide en raison du faible nombre de Reynolds. En outre, dans les dispositifs microfluidiques, on peut créer des modèles *in vivo* avec des conditions précises [44] dans les plates formes de culture en trois dimensions. L'approche microfluidique peut potentiellement révéler le mécanisme de formation d'un biofilm sous-jacent et de résoudre un certain nombre de problèmes lors de sa croissance [45].

I.10 Les avantages de dispositifs microfluidiques

I.10.1 Les faibles volumes

La microfluidique permet le traitement, la manipulation et la miniaturisation des expériences biologiques aux micro volumes [47]. Elle permet également une analyse plus précise [48], plus rapide et surtout moins chère. De plus, un avantage pratique majeur est qu'elle permet de réduire les exigences en volume de milieu de croissance au cours de la formation de biofilm. Cela représente un début à d'autres études qui nécessitent des vitesses de fluide élevées et des expériences de longue durée, sans compromis stérilisation de milieux de croissance lors du remplissage ou le remplacement des réservoirs.

I.10.2 La taille de microcanaux

La taille de micro canaux est bien adaptée pour étudier la croissance d'un biofilm. Le processus de croissance d'un biofilm commence, généralement, par une adhésion de monocouches des bactéries à la surface [49] par des médiateurs extracellulaires tels que les plis et les flagelles. Les cellules individuelles forment des microcolonies et puis forment le biofilm avec des hauteurs dans la gamme autour des dizaines de microns. Les microcanaux,

qui sont sur une échelle de taille compatible [50], sont bien adaptés pour les études de la croissance et le développement des biofilms [23].

I.10.3 Les conditions hydrodynamiques précises

Les paramètres hydrodynamiques permettent de décrire l'état du liquide autour du biofilm qui comprend, normalement, un media nutriment fourni par une pompe externe. Ces paramètres sont le débit, Q ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), la vitesse ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), la force de cisaillement, τ (Pa), la viscosité, μ ($\text{Pa} \cdot \text{s}$) et le nombre de Reynolds, Re (sans unités). La formation, le métabolisme et les colonies immobilisées sur les surfaces sont liés à la condition hydrodynamique. En raison du rapport entre l'aire de la surface et du volume du canal, nous sommes capables de rendre les conditions hydrodynamiques précises et d'établir un profil de température stable à long terme [51], donnant ainsi la possibilité de contrôler le microenvironnement local des cellules et des biofilms microbiens. Dans cette section, deux caractéristiques importantes de l'écoulement dans le microcanal seront expliqués à savoir : 1) l'écoulement laminaire et 2) les forces de cisaillement.

I.10.3.1 L'écoulement laminaire

L'écoulement laminaire des liquides, qui se produit naturellement dans les microcanaux, est une des caractéristiques les plus importantes du dispositif microfluidique. Par exemple, l'écoulement laminaire permet un écoulement parallèle de deux ou plusieurs fluides différents sans être mélangés [46]. La figure 10 montre une séparation de deux liquides miscibles qui sont produit par un débit de confinement (Q_C) est un débit interne (Q_I). Le nombre de Reynolds (Re) (équation 1) décrit si les conditions d'écoulement sont laminares ou turbulentes.

$$Re = \rho v D_H / \mu \quad (1)$$

Où ρ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) est la densité, v ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) est la vitesse moyenne du fluide et D_H (m) étant le diamètre hydraulique du microcanal. D_H est donné par le diamètre de la section transversal dans les canaux cylindriques ou par la base de l'équation 2 pour les canaux rectangulaires.

$$D_H = 2ab / (a+b) \quad (2)$$

Où a et b sont la largeur et l'épaisseur du canal, respectivement. La viscosité dynamique du fluide correspond à la contrainte de cisaillement (parallèle du canal) qui accompagne l'existence d'un gradient de vitesse du liquide (perpendiculaire du mur du canal), donné par l'équation 3.

$$\mu = \tau / \Delta v \quad (3)$$

Généralement, les conditions laminaires sont dominantes si $Re < 2300$. Grâce au faible diamètre hydraulique dans les microcanaux, $Re < 1$, ce qui est inférieur à la limite (Équation 1).

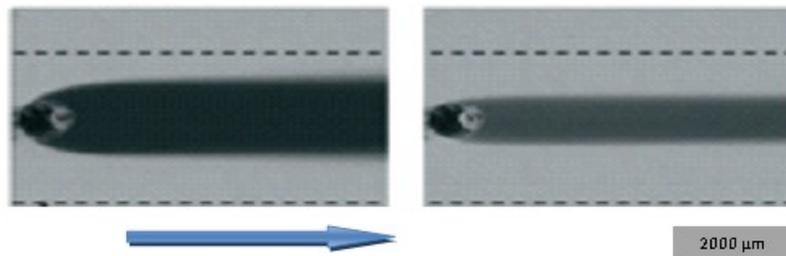


Figure 9 : Micrographies optiques de microcanal comprenant : Deux circulations de flux laminaire chargé avec des débits (a) $Q_C = 0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et $Q_I = 0.3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et (b) $Q_C = 1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et $Q_I = 0.3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. La direction de l'écoulement pour Q_C et Q_I (a) et (b) est indiqué par la flèche. La barre d'échelle est la même pour (a) et (b) [52].

1.10.3.2 Les forces de cisaillement

La formation, la structure finale, la morphologie, la densité et le métabolisme des biofilms ont une relation étroite avec les conditions hydrodynamiques [49]. Plus précisément, la force de cisaillement appliquée à l'interface du biofilm est essentielle dans la détermination de ces propriétés. Durant les étapes initiales de croissance du biofilm, la force de cisaillement affecte les cellules bactériennes. Les forces de cisaillement peuvent également causer le détachement du biofilm. C'est une étape importante de son cycle de vie et cela présente une influence sur sa croissance, sa structure et sa stabilité. Le contrôle du pH à des débits différents peut être un moyen d'étudier le transfert de masse et les propriétés structurales des biofilms, tels que la densité et de la porosité. Par la suite, l'utilisation de la microfluidique pour générer des flux dans des conditions précises peut révéler des effets hydrodynamiques subtils sur l'échange moléculaire entre le biofilm et le liquide environnant. Par exemple, la figure 10

montre que l'équilibre est atteint suite à des changements de débits. Par conséquent, des débits plus élevés peuvent éliminer plus efficacement les espèces d'acide [48].

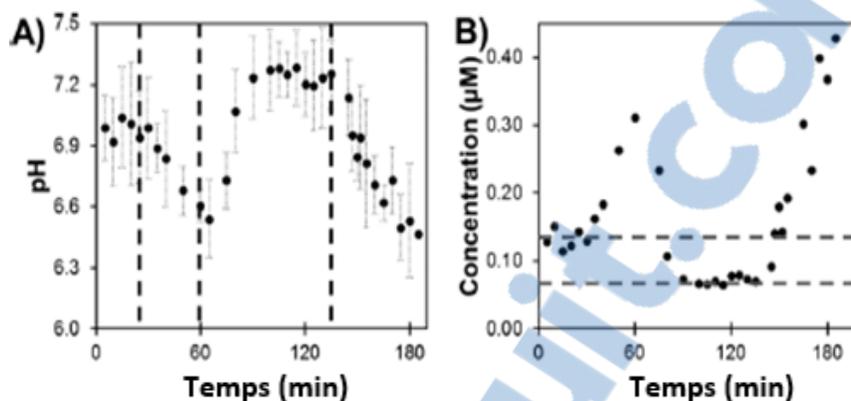


Figure 10 : (A) la variation du pH en fonction de temps dans des conditions d'écoulement $Q_1 = 0,1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $0 < t < 20 \text{ min}$; $Q_2 = 0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $20 < t < 60 \text{ min}$; $Q_3 = 0,3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $60 < t < 130 \text{ min}$; $Q_4 = 0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ $130 < t < 185 \text{ min}$. Les lignes pointillées indiquent les moments où les conditions d'écoulement ont été changées.

Les barres d'erreur ont été générées à partir de 4 zones de mesure distinctes.

(B) Variation de la concentration de protons calculée avec le temps. Les lignes horizontales pointillées montrent l'équilibre des concentrations pour $Q_1 = 0,1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ (ligne supérieure) et $Q_3 = 0,3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ (Ligne inférieure) [23].

I.11 Fabrication des dispositifs microfluidiques

De nos jours, beaucoup de chercheurs utilisent les polymères pour leur simplicité d'usage et la facilité à établir des protocoles de fabrication contrôlés (figure 11). Les polymères permettent de tester rapidement une application ou une conception sans perdre de temps. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est un élastomère transparent, biocompatible (très proche des gels silicones utilisés dans les prothèses mammaires), déformable, peu cher et facile à mouler et à coller sur du verre. Pour ces raisons, il a été sollicité par les chercheurs du domaine. Le PDMS est un élastomère hydrophobe. Ainsi, les solvants polaires comme l'eau ont du mal à mouiller le PDMS (l'eau forme des gouttes et ne s'étale pas) et conduisent à l'adsorption des contaminants hydrophobes présents dans l'eau.

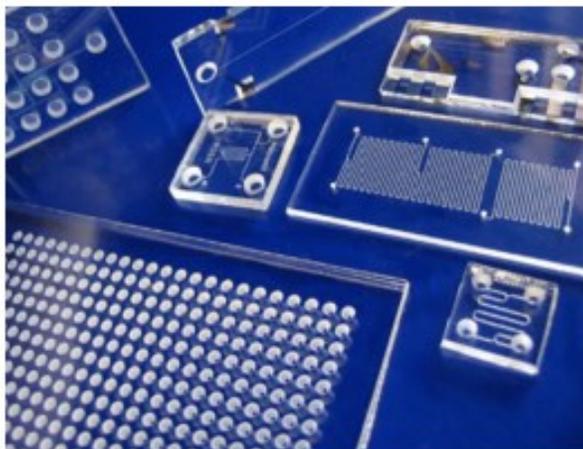


Figure 11 : Des dispositifs microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS) [53].

II. Les matériaux et appareils utilisés

II.1 Les nanoparticules type MCM-48

Les MSNs de type MCM-48 ont été choisis pour leur structure poreuse 3D, leurs pores suffisamment larges pour accommoder des agents antimicrobiens (3.2 nm), leur surface spécifique élevée ($\sim 1300 \text{ m}^2/\text{g}$) pour l'inclusion d'une grande quantité de substances bioactives et leur biocompatibilité. La taille moyenne des nodules est de $130 \pm 50 \text{ nm}$. Notons que la dispersion sera d'autant plus améliorée que la taille moyenne des nanoparticules est faible.

La solution colloïdale, refermant les nanoparticules de silice mésoporeuses en suspension, nous a été transmise par le groupe de Kleitz. Signalons, qu'afin de prétendre à une bonne suspension, il s'est avéré que la concentration maximale ne doit pas dépasser au départ 50 mg de silice par mL d'eau. Ainsi, le rendement moyen d'une telle mise en suspension est de 50 %. Ceci dit, la concentration moyenne minimale susceptible d'être utilisée dans notre étude ne devrait pas être située en delà de 25 %.

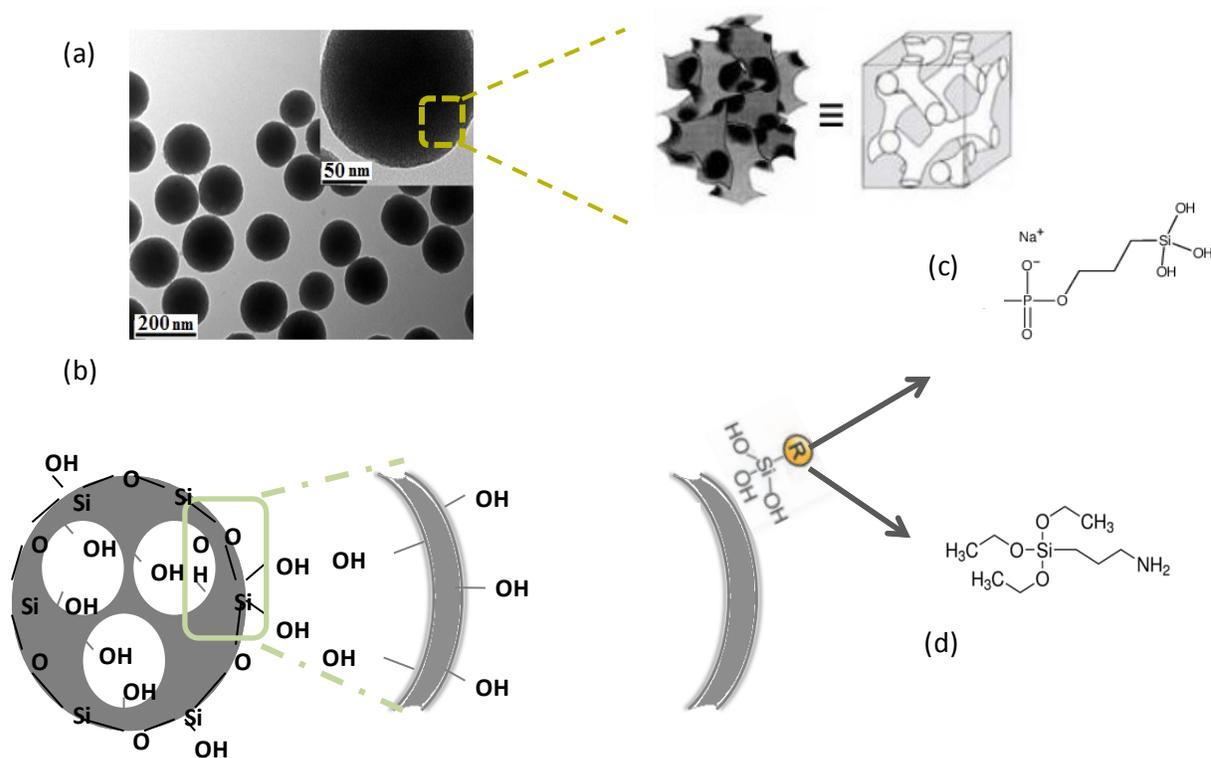


Figure 12 : Schéma représentatif pour : (a) les MCM-48 vide, (b) après fonctionnalisation (c) avec le 3-(trihydroxysilyl) propyl methyl phosphonate monosodium, (d) (3-aminopropyl) triethoxysilane.

Les MCM-48 MSNs de type 3-D avec un réseau cubique, ont été synthétisés comme décrit dans la littérature [41]. Nous avons utilisé quatre suspensions présentant des différentes concentrations et fonctionnalisations (figure 12) : (i) MSNs sans fonctionnalisation : concentration 24 et 30 mg/mL, (ii) MSNs-NH₂ (1) = 32,5 mg/mL, MSNs-NH₂ (2) = 58,6 mg/mL, et MSNs-Phosphonate = 51,4 mg/mL.

II.2 Les fluorophores

Dans ce projet, nous avons utilisé deux types de fluorophores : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (sigma-Aldrich, Canada) et fluorescéine amine, isomère I (sigma-Aldrich, Canada) qui possèdent un pic d'excitation et d'émission situé à 495 et 521 nm, respectivement.

II.3 Les souches bactériennes, conditions de culture

La bactérie *Streptococcus salivarius* a été choisie en fonction de sa capacité à former un biofilm et à changer le pH autour de son environnement. De plus, le *Streptococcus salivarius* joue un rôle important dans la santé orale. Cette souche est Gram positif et sphérique. Elle était cultivée dans le dispositif microfluidique, en utilisant un milieu de Luria-Bertani (LB) de croissance modifiée, contenant 0,1 % en poids de NaCl 0,1 % de tryptone et 0,05 % en poids de levure extrait. Certaines solutions de croissance pourraient contenir 0,1 % en poids de glucose.

II.4 Le dispositif microfluidique MF (matériels et équipements)

Les dispositifs microfluidiques testés sont constitués de PDMS (Sylgard184, Dow Corning, Canada), obtenus par moulage. Un couvercle en verre était utilisé pour l'obturation du micro-canal (VWR, Mississauga, Canada) grâce à sa transparence. De plus, leur épaisseur (170 μm) était compatible avec la distance de travail courte des lentilles d'haute résolution. Nous avons utilisé l'élastomère polydiméthylsiloxane, PDMS parce qu'il est biocompatible (il est étanche à l'eau, non toxique pour les cellules et perméable aux gaz), facile à manipuler et sa transparence est compatible avec de nombreux procédés optiques de détection.

II.5 Les accessoires microfluidique

Une pompe à seringue (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) a été utilisée pour injecter des liquides dans les entrées des dispositifs microfluidiques. Les tubulures de connexion ont été réalisées en perfluoroalkoxy (PFA), leur diamètre extérieur est de 1,6 mm (U-1148, IDEX, WA, USA) ; ils sont chimiquement inertes, non toxiques, non poreux, flexibles et transparents. Pour assurer une bonne étanchéité, en cas de fuites, nous utilisons une colle époxy.

II.6 Les matériels expérimentaux

II.6.1 Le microscope optique à lumière blanche

Dans ce projet, les micrographies optiques de revêtement ont été acquises à l'aide d'un microscope optique inversé (Olympus IX73, MA, USA) avec éclairage sur fond clair. Les tests d'adhésion de dépôt ont été enregistrés à grossissement 2x (ouvertures numériques 0,06) alors que les images à haute résolution de dépôt ont été acquises à 100x de grossissement (ouverture numérique de 0,9). Les images ont été recueillies au moyen d'une caméra CCD monochrome non refroidie (Lumenera Infinity 3-1, Ottawa, Canada), avec un gain de 10 fois et temps d'exposition de 25 ms.

II.6.2 Le microscope optique à lumière fluorescente

Dans notre étude, nous avons eu recours au microscope muni d'une lumière fluorescente de type Olympus IX73. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps capables d'émettre de la lumière après avoir absorbés des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Le déplacement de Stokes décrit la différence entre la longueur d'onde absorbée et émise par l'objet. Plus la différence entre les deux longueurs d'onde est grande, plus l'observation de la fluorescence est aisée. Toutes les images ont été recueillies à l'aide d'une caméra CCD monochrome non refroidie (type Lumenera Infinity 3-1, Ottawa, Canada) avec un gain qui varie entre 10 jusqu'à 42 et un temps d'exposition de 500ms. Les photos ont été traitées avec le logiciel ImageJ, un programme de traitement d'image conçu pour les images multidimensionnelles scientifiques. ImageJ est hautement extensible, avec des milliers de plugins et des macros pour effectuer une grande variété de tâches.

II.6.3 Le microscope confocale à balayage laser (CLSM)

Pour étudier l'épaisseur de notre dépôt à base de MSNs et le relargage de fluorophore, nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) dans la direction Z. Les images ont été capturés sur un microscope confocal (Olympus FV1200 IX83, MA, USA) à

des intervalles de temps de 3h à 1h, en utilisant un grossissement 4x et 10x, avec une excitation de la protéine fluorescente verte à 488 nm et la détection de l'émission avec un filtre passe-bande de 500 nm à 515 nm. Toutes les images recueillies étaient de dimension 176,13 μm x 176,13 μm .

Tableau 2 : Comparaison entre les objectifs de CLSM.

Objectif	L'ouverture numérique	Distance de travail (mm)	La résolution (μm)	
			X, Y	Z
4X	0.13	17	2.90	13.10
10X	0.4	3.1	1.24	2.80
40X	0.95	0.18	0.30	0.70
60X	1.42	0.15	0.16	0.40

II.6.4 La Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

Dans le cadre de notre étude, la spectroscopie FTIR a été utilisée avec l'accessoire ATR diamant (Golden-Gate) (figure 13) pour étudier la quantité de l'éthanol qui reste dans le dépôt de MSNs après le séchage lors d'injection de fluorescéine soluble dans l'éthanol.

Les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre infrarouge Magna-850 (Thermo Nicolet, Madison, WI) à transformée de Fourier munit d'un détecteur MCT (mercure de tellure-cadmium) refroidit à l'azote liquide ainsi qu'une lame séparatrice en bromure de potassium. Nous avons utilisé un accessoire ATR diamant « le Golden-GateTM » (Specac Ltd., London, U.K.). Le logiciel qui contrôle le spectromètre est OMNIC (ThermoElectron, Madison, WI). Les spectres étaient enregistrés à une résolution de 4 cm^{-1} et comptent l'accumulation de 128 interférogrammes.



Figure 13 : Le spectromètre FTIR avec l'accessoire ATR diamant.

II.7 Procédures expérimentales

II.7.1 La microfluidique

II.7.1.1 Conception géométrique du dispositif MF

La géométrie d'un système microfluidique pour le passage du flux est généralement déterminée par trois paramètres : la largeur du canal central ($l=2\text{mm}$), la longueur du canal ($L=36\text{mm}$) et la profondeur du canal ($h=400\mu\text{m}$). Le système de géométrie linéaire ainsi conçu est représenté sur la figure 14.

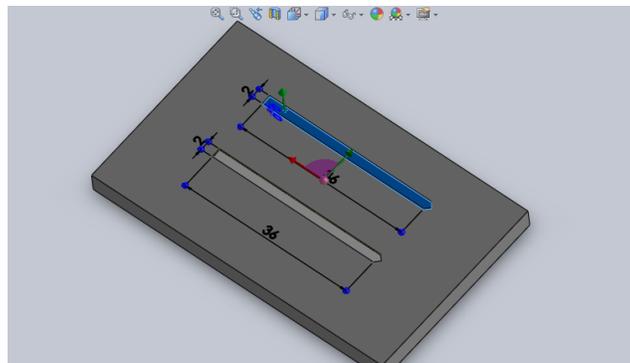


Figure 14 : Conception 3D du dispositif microfluidique (SolidWorks) du microcanal avec profondeur de $400\ \mu\text{m}$ (couleur bleue), largeur 2 mm et longueur 36 mm.

La première étape était la conception des microcanaux. Pour les dessiner, nous avons utilisé les logiciels de conception assistés par ordinateur Elphy Plus (Raith) ou AutoCAD (Autodesk). Le dessin final a été envoyé au format numérique pour impression sur masque souple, à l'équipe de fabrication du laboratoire.

II.7.1.2 Fabrication de moules par photolithographie

Les moules ont été réalisées par photolithographie. Une fois les dessins imprimés sur une pellicule plastique transparente en masque souple, l'étape de photolithographie telle qu'elle est représentée sur la figure 15, est réalisée en salle blanche avec un éclairage dépourvu d'ultraviolet pour éviter la réticulation intempestive de la résine photosensible. Sur un substrat de silicium, une résine photosensible SU-8 (Microchem, USA) est déposée puis étalée par force centrifuge (spin-coating) en vue d'obtenir une couche plane et homogène.

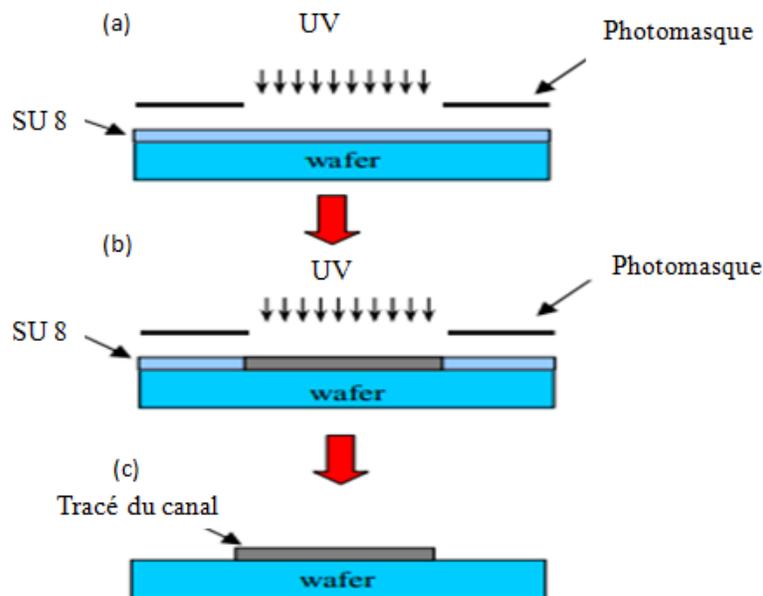


Figure 15 : Étapes de fabrication d'un moule microfluidique par photolithographie.
 (a) La déposition de la résine sur une plaquette de silicium,
 (b) chauffage et l'exposition sélective à travers un masque,
 (c) enlèvement du résine photo résistante par un révélateur révèle le tracé du canal.

La hauteur de la résine est nécessaire pour fixer la profondeur des microcanaux. Quant à la largeur des canaux, elle est définie directement par le dessin du masque. Après chauffage de la résine, le canal est exposé aux ultra-violets à travers le masque sur toute sa longueur. Sur

le masque, le motif des canaux est dessiné en négatif, car la résine épouse la forme du canal. L'insolation déclenche la polymérisation de la résine qui devient ainsi insensible au révélateur tout en restant sur le substrat. Par la suite, la plaque a été plongée dans le révélateur. Après révélation, la plaque est chauffée à plus de 150 °C pendant quelques heures pour consolider l'interface au contact résine-substrat.

II.7.2 Fabrication du réacteur microfluidique

Nous décrivons ici la fabrication par moulage d'une puce microfluidique en PDMS. L'étape de moulage permet de fabriquer en série les puces microfluidiques à partir d'un moule (figure 16).

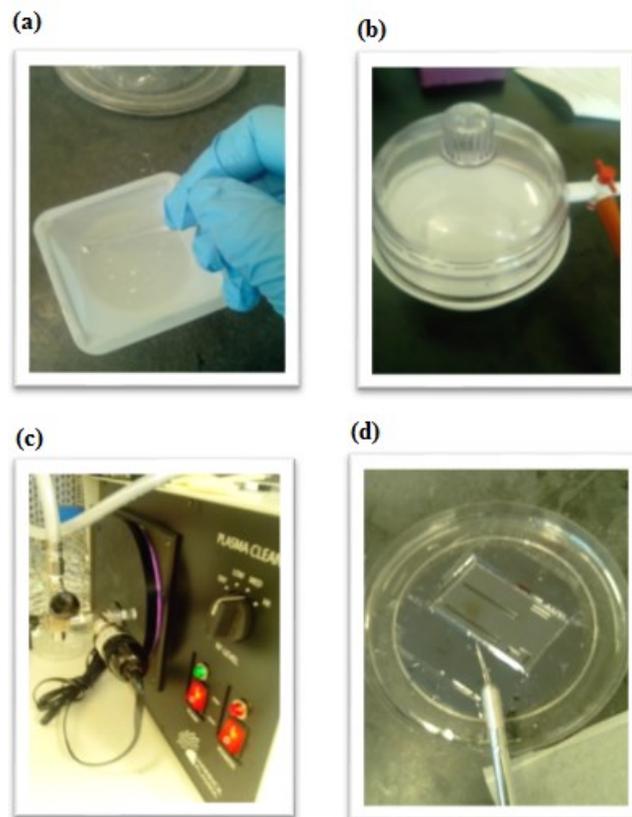


Figure 16 : Les différentes étapes de fabrication du dispositif microfluidique
(a) mélange (PDMS/Durcisseur) 90/10, (b) dégazage sous vide, (c) moulage/démoulage de la moitié du canal MF et (d) traitement plasma de la surface du PDMS.

- Première étape : on mélange le PDMS (liquide) avec un agent réticulant (durcisseur du matériau) dans une proportion de 90/10 puis on procède à un dégazage sous vide afin d'éliminer les bulles d'air. Ensuite, on verse le mélange sur le moule et on place l'ensemble dans un four à une température de 70 °C pendant 4 heures.
- Deuxième étape : Une fois que le PDMS a été durci, on procède à sa séparation du moule.
- Troisième étape : En vue de permettre l'injection des fluides pendant les expériences futures, les entrées et sorties du dispositif microfluidique sont percées à l'aide d'une aiguille.
- Quatrième étape : Enfin la face du bloc de PDMS avec les microcanaux est collée sur un autre bloc de PDMS plan à l'aide d'un traitement plasma pour fermer la puce microfluidique.

II.7.3 La culture du biofilm

La préculture de *Streptococcus salivarius* a été utilisée comme inoculum pour la formation de biofilm. L'inoculum de culture en suspension a été obtenu en secouant les cultures dans 3 mL de milieu de croissance de 3mM pour 300 TPM pendant 18 h à 30 °C. Avant l'inoculation, le système microfluidique a été désinfecté avec de l'éthanol 70 % pendant 30 min, puis rincé à l'eau distillée stérile pendant 1 h.

II.7.4 Stratégies de fixation d'un dépôt de MSNs sur un microcanal MF

Dans une perspective permettant d'aboutir à un revêtement sous forme de couches minces au niveau des murs du canal microfluidique de section rectangulaire en PDMS, nous avons testé différentes procédures de fixation plus ou moins rentables ou fructueuses.

L'intérêt des couches minces provient de la particularité des propriétés physicochimiques acquises par le matériau au niveau de son épaisseur. C'est pourquoi les couches minces jouent un rôle de plus en plus important dans le domaine de la nanotechnologie. Elles représentent un enjeu économique incontestable d'autant plus que leurs techniques de mise en œuvre sont relativement simples et que leurs coûts d'élaboration sont peu onéreux. Les couches minces de

NPS mésoporeuses, objet de notre étude, sont élaborées en milieu liquide en utilisant diverses procédures. Les processus que nous avons retenus au début sont nombreux et très variés. Le but étant d'améliorer, à chaque fois, la qualité du dépôt, ceci, tout en tenant compte du caractère hydrophobe du microcanal en PDMS alors que celui de la suspension est hydrophile.

II.7.4.1 Les injections successives de suspension de NPS dans le microcanal

Cette stratégie consiste à injecter, chaque heure, une quantité de notre suspension dans le microcanal à l'aide d'une seringue et un tube. Tout le dispositif est monté sur une plaque chauffante de type Corning PC-351 Hot Plate Stirrer, dont la température était fixée à 50°C. Le champ de vision est représenté sur la figure 17. On remarque que les multicouches de nanoparticules de silice sur le canal MF en PDMS laissent passer la lumière, ce qui implique que les nanoparticules silice mésoporeuses sont biréfringentes.

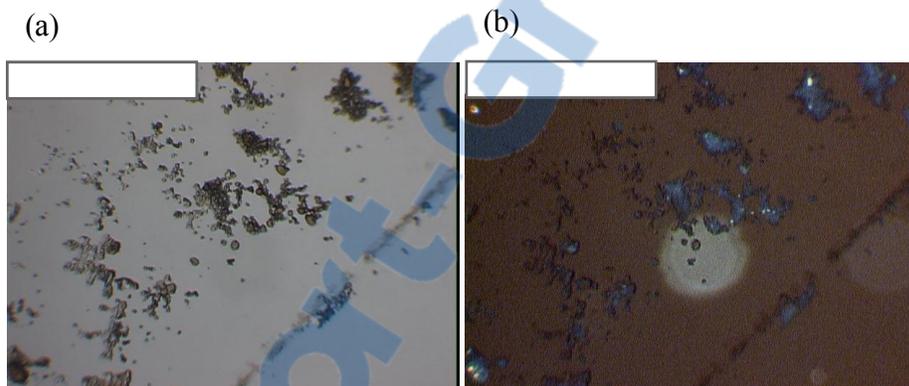


Figure 17 : Photos Obtenues au microscope sous lumières blanche (a) et polarisée (b) pour les suspensions sous forme de dépôt sur les murs de microcanal au milieu de microcanal en PDMS. Toutes les observations sont prises avec un objectif à grossissement 2x. Les barres d'échelle sont 1000 μm .

II.7.4.2 Dépôt par la technique « flow-deposition »

Le principal avantage de cette technique est la rapidité d'exécution pour l'obtention des couches minces aux températures relativement basses. Le principal inconvénient de cette technique est la lourdeur des équipements qui va rendre la synthèse des couches minces assez onéreuse. De plus, on ne peut traiter que des petites surfaces pour lesquelles les dépôts, malgré toutes les précautions, seront discontinus sur les murs de microcanal.

Une fois le dispositif microfluidique en PDMS réalisé, on obtient un microcanal avec une entrée et une sortie bien déterminées. Cette stratégie consiste tout d'abord à connecter l'entrée et la sortie par les capillaires du coude en métal qui s'adaptent étroitement dans les entrées perforées. L'entrée est connectée à une seringue de 5 mL qui contient 3 mL de notre suspension (lot 2), celle-ci est montée sur une pompe à seringue pour injecter le liquide dans le dispositif microfluidique avec un débit très faible de 0,5 mL/heure. Tout ce montage est relié à un système de chauffage alimenté par thermocouple (système de contrôle de température OMEGAETTE) pour stabiliser la température le long de microcanal ; pour cela on a fixé la température à l'intérieur du microcanal à 40 °C, comme le montre la figure 18.



Figure 18 : Montage pour le dépôt d'une couche de NPS fait avec un débit.

Après un séchage complet du dispositif MF contenant le dépôt NPS, nous avons étudié les caractéristiques optiques des échantillons par microscopie. L'évolution structurale des échantillons en fonction du nombre de couches déposées a été examinée au microscope optique de type AXIOVERT25, BX51M relié à un micro-ordinateur sur lequel s'affichent les micrographies. La figure 19, nous avons présenté les surfaces obtenues au microscope aussi bien sous lumières blanches que polarisées du dépôt formé par écoulement sur les murs du canal.

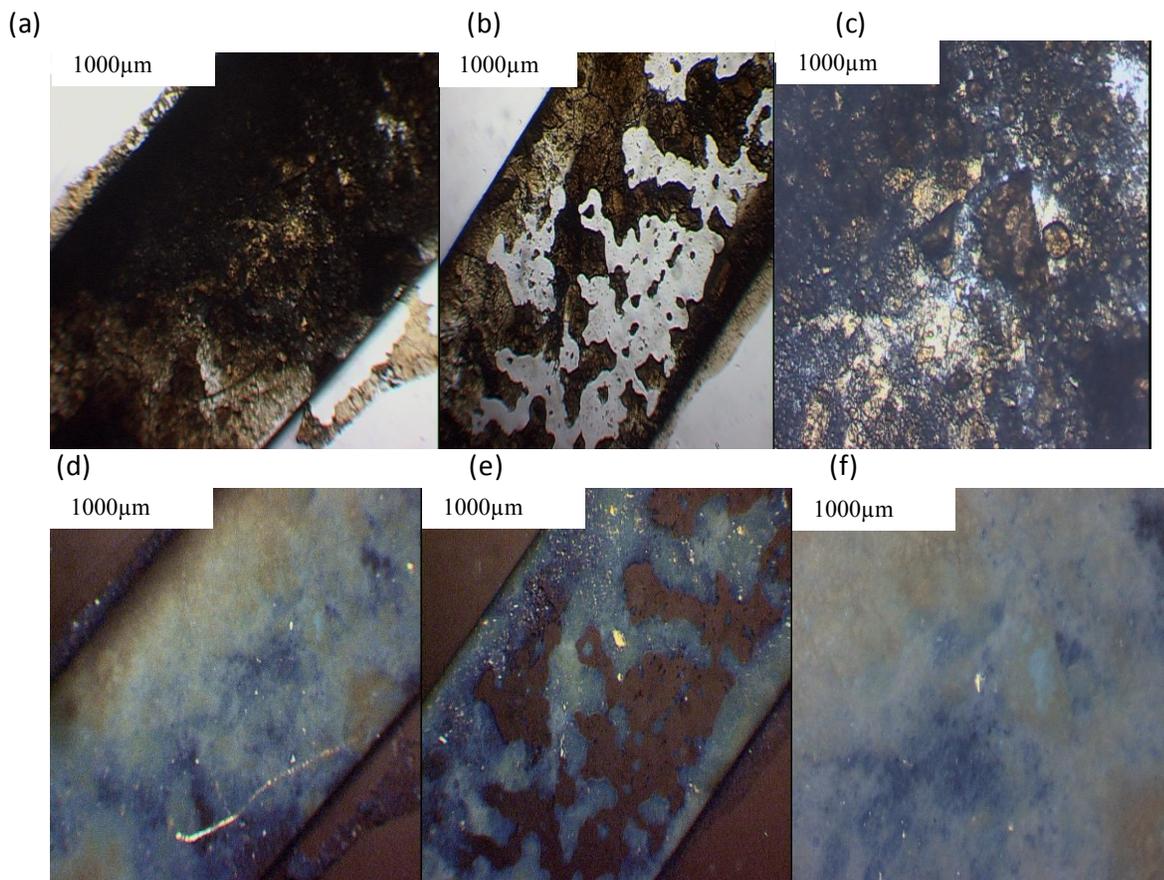


Figure 19 : Surfaces obtenues au microscope sous lumières blanche et lumière polarisé : (a) et (d) au milieu du canal, (b) et (e) à l'entrée du canal avec un objectif 2x, (c) et (f) au milieu du canal avec un objectif 10x du dépôt formé par écoulement sur les murs de canal.

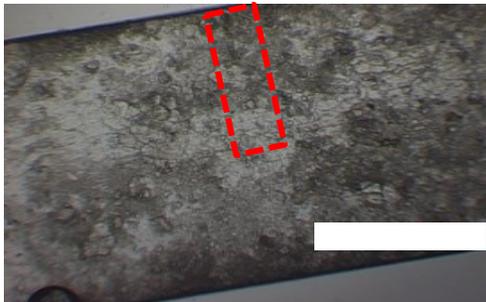
II.7.4.3 Test d'adhésion de dépôt et influence de flux hydrodynamique

Ce test consiste à faire un lavage par l'eau du dépôt après séchage à l'aide d'une pompe à seringue pour faire varier le débit de flux d'eau à chaque intervalle de temps. L'ensemble du montage est placé sur un microscope optique à lumière blanche, de type (Axioscope Zeiss), afin d'analyser les images à chaque instant. Ce test nécessite deux heures de temps, avec un ordre croissant de débits, depuis le plus faible (0.1 mL/h) jusqu'à plus élevé (3 mL/h).

La figure 20 montre les surfaces obtenues au microscope sous lumières blanches suite au test d'adhésion du dépôt sur le microcanal aux différents débits.

On remarque les couches déposées sur le substrat microfluidique en PDMS, constituées de MSNs présentent une bonne adhérence. De plus, le dépôt paraît bien uniforme sur une majeure partie des surfaces que ce soit au faible ou bien au fort débit d'écoulement de la suspension. Toujours est-il que le caractère hydrophile de la solution utilisée par rapport au support MF (hydrophobe) pose problème en vue de l'obtention d'une meilleure qualité de dépôt.

(a)



(b)

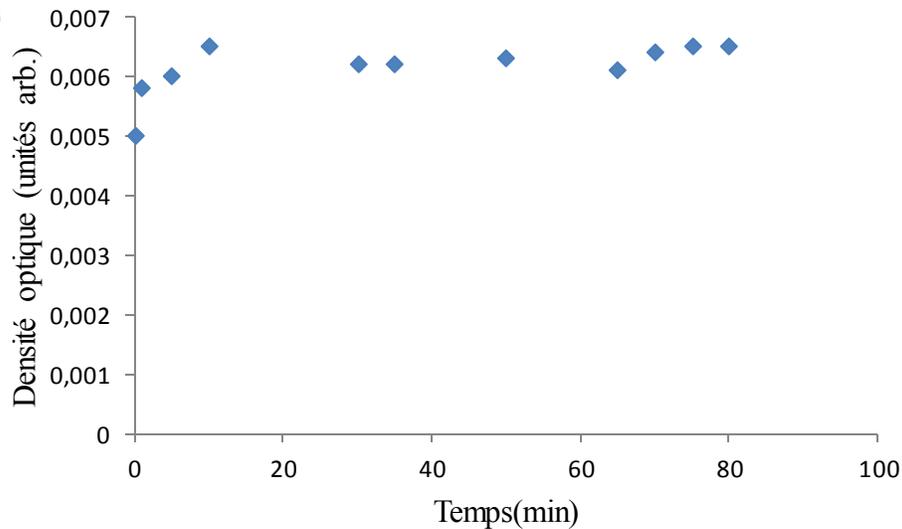


Figure 20 : (a) Les surfaces obtenues au microscope sous lumières blanches suite au test d'adhésion du dépôt sur le microcanal aux différents débits. La barre d'échelle est 1000 μm . (b) Mesure de la densité optique des surfaces obtenues (rectangle rouge zone de mesure de DO) suite au test d'adhésion en fonction de temps.

II.7.5 Fixation du dépôt au milieu du microcanal MF ouvert par traitement par un surfactant anionique

Cette opération consiste à injecter une quantité de notre suspension vierge au milieu du microcanal ouvert. Puisque la suspension est hydrophile, lorsque nous allons la déposer au milieu du canal microfluidique en PDMS qui est par contre hydrophobe, au bout d'un certain temps la quantité injectée se rétrécit sous forme d'une goutte avec un angle de contact très importante. Pour remédier à ce phénomène, la solution que nous proposons pour avoir une compatibilité des deux surfaces à savoir la suspension hydrophile et le PDMS hydrophobe, consiste en un traitement de surface de PDMS avec un surfactant (tensioactif) anionique comme le savon. Les savons sont des sels d'acides gras, de formule générale $RCOOM$ (où R est une longue chaîne hydrocarbonée et M est un métal, un alcalin ou une base organique). Dans notre étude, nous avons utilisé un savon avec un dérivé sulfaté (exemples : laurylsulfate de sodium et laurylsulfate de triéthanol amine), très utilisé comme agents émulsionnant ou moussant, caractérisé par un fort pouvoir mouillant. Ce traitement consiste à bien frotter la surface du PDMS par le savon avec rinçage à l'eau. Après un séchage du substrat PDMS, on injecte la suspension de NPS au milieu du microcanal (figure 21).



Figure 21 : Suspension de MSNs positionnée au milieu du microcanal en PDMS après un traitement par un liquide de la vaisselle (#MS0500424, Canada).

Nous avons obtenu une suspension qui s'étale sur la partie du microcanal désirée. On accélère la déposition par séchage à température ambiante. Par la suite, un traitement plasma pour fermer le microcanal a été réalisé (figure 22).

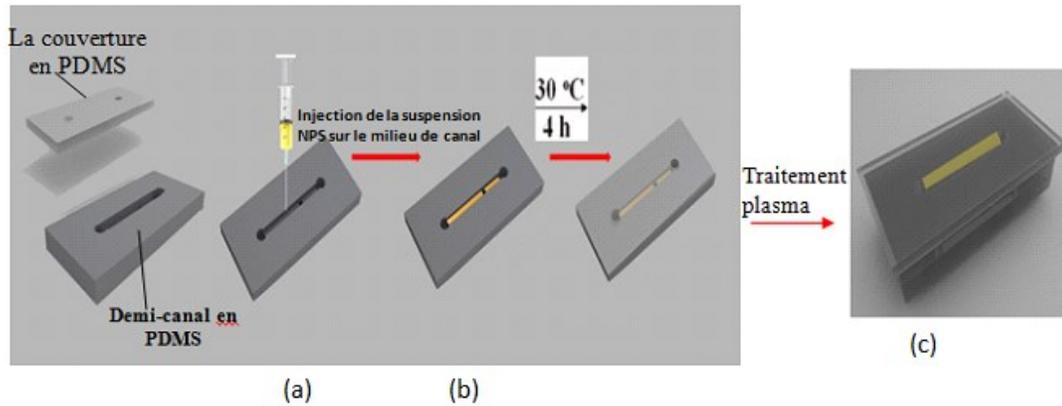


Figure 22 : Étapes d'élaboration d'un dépôt de NPs : (a) injection de la suspension de MSNs dans le milieu de canal ouvert, (b) séchage, (c) fermeture de demi-canal par plasma.

Après formation d'un dépôt paraissant homogène à l'œil nu, nous avons analysé la couche de NPS située au milieu de microcanal par microscopie sous lumière blanche. Le résultat obtenu est représenté sur la figure 23.

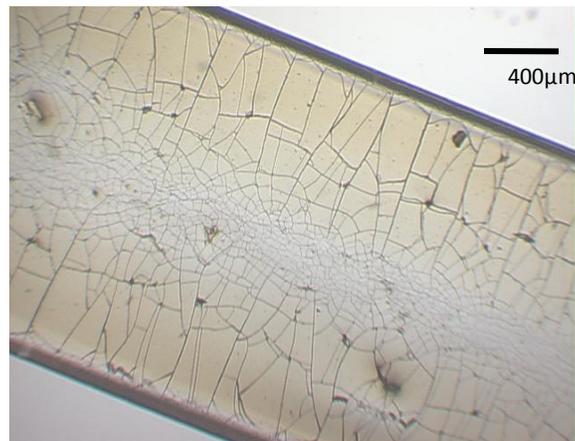


Figure 23 : Dépôt de MSNs au milieu du microcanal observé sous la lumière blanche.

II.7.6 Mesure des cinétiques de relargage aux différents débits par microscopie *in situ*

Ce processus de mesure cinétique consiste, tout d'abord, à préparer une solution de fluorescéine isothiocyanate (FITC) dans l'eau avec une concentration de 0.1 mg/mL. Après, nous avons injecté environ 1 mL de la fluorescéine au milieu du microcanal renfermant le

dépôt de NPS mésoporeuses comme illustré dans la figure 24. L'étape finale de séchage dure une heure.

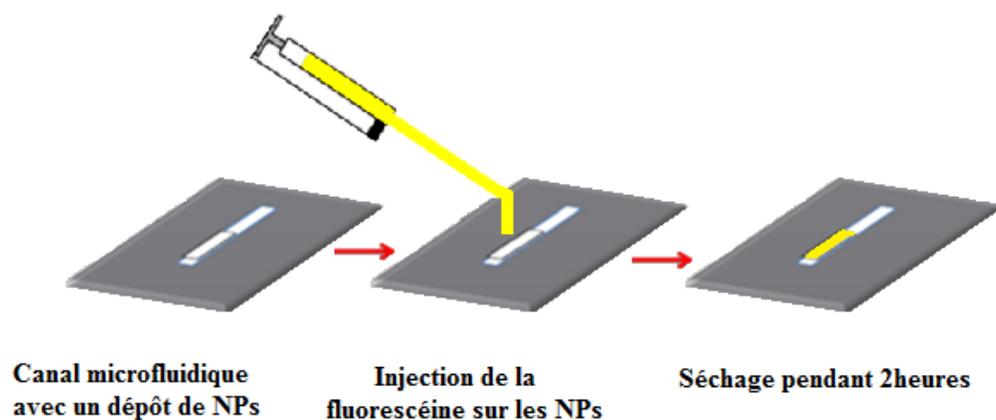


Figure 24 : Injection d'une quantité de fluorescéine sur le dépôt de NPs.

Après séchage complet de la couche NPs contenant la fluorescéine, nous avons monté le dispositif permettant de contrôler la désorption de la fluorescéine des MSNs. Ce montage permet aussi le lavage à l'eau des NPs avec un débit constant égal à 1 mL/h. Ce dispositif est relié au microscope à lumière fluorescente (figure 25). La source lumineuse fluorescente est placée au niveau de la partie vide située juste en aval du dépôt, ceci, afin de pouvoir suivre au cours du temps la fluorescéine libérée des NPs.



Figure 25 : Montage pour la surveillance du relargage de la fluorescéine des MSNs.

III. Résultats et discussions

III.1 Solubilité de fluorophore

Comme discuté dans la Section II.2, nous avons utilisé les fluorophores FITC et la fluorescéine isomère I. Pour la première, la solubilité était assez grande et constante en pH, donc nous n'avons pas de précipitation. Cependant, pour l'autre, la solubilité était sensible au pH. Pour comprendre la relation entre solubilité de la fluorescéine amine et le pH, nous avons mesuré la masse soluble dans des différents pH. Le tableau 3 et la figure 26 représentent les résultats de solubilités de fluorescéine amine en fonction de pH.

Tableau 3 : Protocole expérimental de la solubilité de la fluorescéine aminée isomère I dans les différentes solutions tamponnées.

	pH 2	pH 4	pH 5	pH 7	pH 8	pH 9
Masse utilisée	20 mg					
Masse restée après filtrage et séchage	17 mg	14 mg	12 mg	10 mg	3 mg	0 mg
Masse soluble	3 mg	6 mg	8 mg	12 mg	17 mg	20 mg
Volume utilisé	35 mL					
Concentration (μM)	0.228	0.457	0.61	.914	1.29	1.52
Solubilité max. (mg/mL)	0,09	0,17	0,22	0,34	0,48	0,57

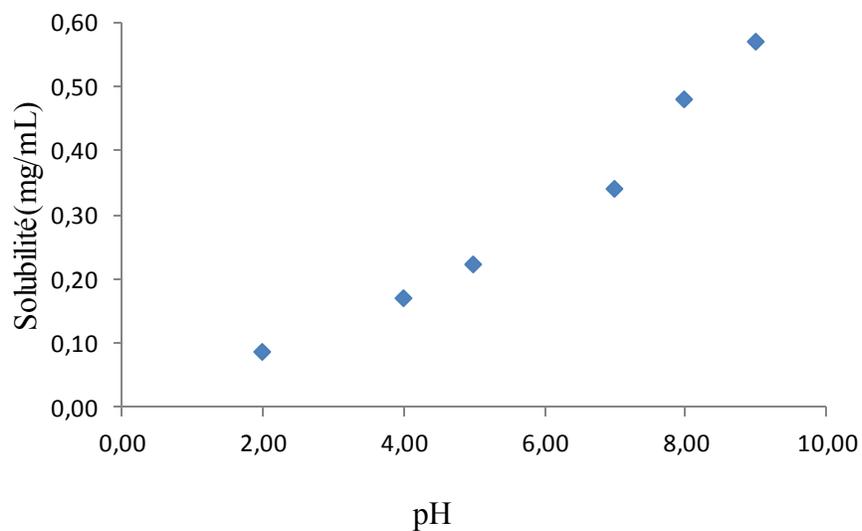


Figure 26 : La variation de la solubilité de fluorescéinamine dans les différentes solutions tamponnées.

Pour étudier l'influence de pH sur l'émission de la fluorescence, nous avons mesuré l'intensité fluorescente de la fluorescéineamine dans les différentes solutions tampons (différents pH) (figure 27).

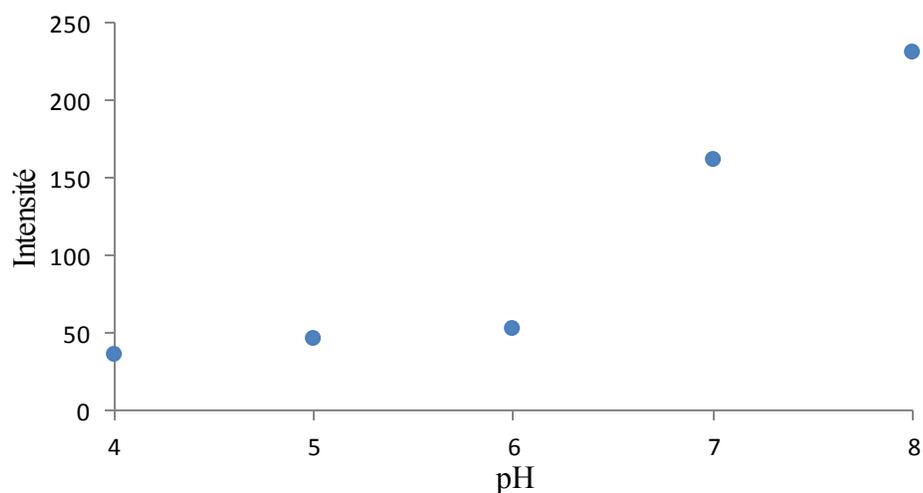


Figure 27 : La variation de la solubilité de fluorescéinamine avec une concentration $0.457 \mu\text{M}$ dans les différentes solutions tampons en fonction de l'intensité de la lumière fluorescente. Barres d'erreurs (plus petites que les marqueurs) étaient fait par l'écarte-type de trois mesures séparées.

III.2 Courbes de calibration

Au début de cette étude, nous avons analysé le relargage des fluorophores déposés sur et dans les NPs, tout en mesurant l'intensité mesurée au niveau du canal au cours de chaque lavage. Dans cette partie, nous avons procédé de façon à affiner davantage nos résultats. Ainsi, au lieu de nous baser sur la mesure de l'intensité de la lumière fluorescente du canal, nous avons opté pour une mesure directe en temps réel des concentrations des fluorophores libérées au cours du temps dès la sortie du dépôt. Pour ce faire, nous avons au préalable tracé des courbes de calibration qui représente l'évolution de l'intensité en fonction de la concentration pour les deux fluorophores utilisés. Ainsi, nous avons préparé des solutions de fluorescéine aux concentrations différentes. Après avoir déterminé l'intensité de lumière fluorescente correspondant à chacune des concentrations, nous avons tracé une courbe de tendance (figure 28), pour généraliser l'application des données aux expériences. Dans les deux cas, l'intercepte était plus que 0, que nous rapportons à un signal de fond.

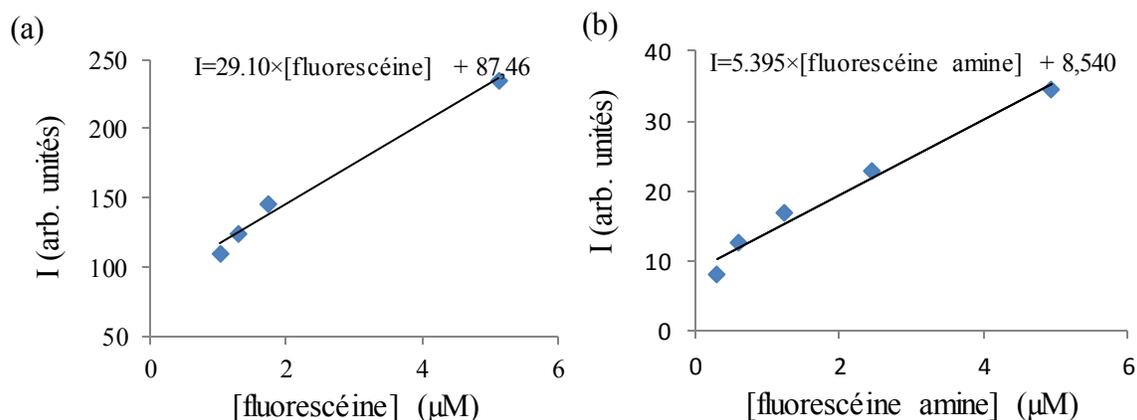
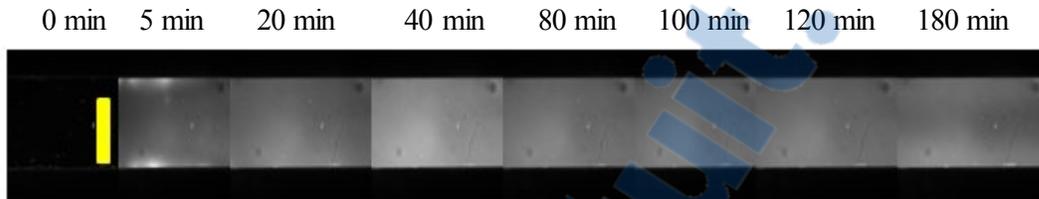


Figure 28 : L'intensité de la lumière (I) en fonction de la concentration des molécules (a) fluorescéine et (b) fluorescéinamine. Chaque courbe était obtenue au pH=7 et avec les mêmes paramètres d'acquisition (gaine 10 et temps d'exposition de 500 ms).

III.3 Mesure de la libération de fluorescéine dans les MSNs vide (sans fonctionnalisation)

Les résultats obtenus sous forme d'images microscopiques (figure 29) au bout de trois heures de lavage à un débit de 1 mL/h. Afin de pouvoir étudier l'influence du débit sur le rendement de la résorption, nous avons effectué des analyses avec un flux de 2 mL/h pour $t = 160$ min.



Les photos ont été traitées avec le logiciel ImageJ, qui consiste à mesurer l'intensité de la lumière à chaque instant (figure 29). La figure 30 représente la courbe de variation de l'intensité la lumière fluorescente en fonction du temps de lavage.

Figure 29 : Photos microscopiques du premier dispositif MF lors du premier lavage pour la fluorescéine (rectangle jaune: zone de mesure de l'intensité fluorescente).

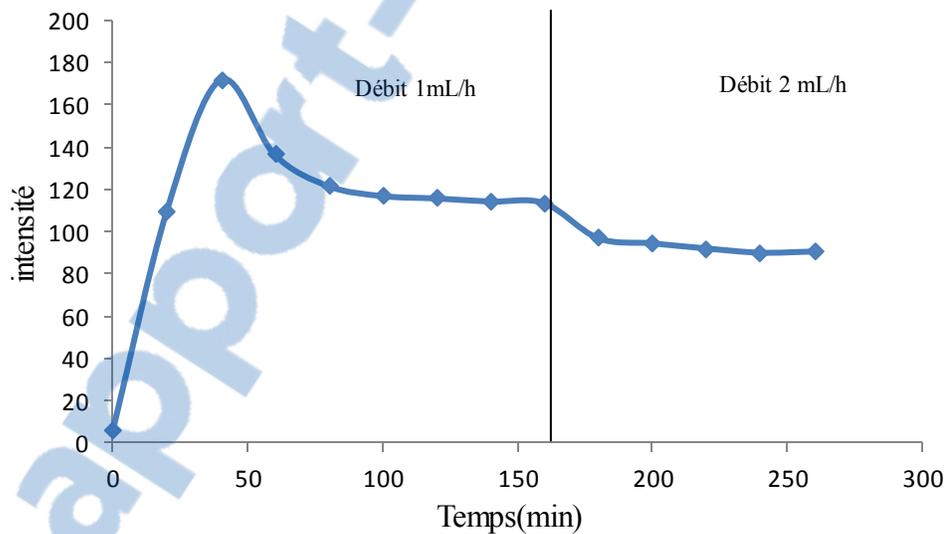


Figure 30 : Évolution de l'intensité de la lumière émise de la fluorescéine au cours du temps. La ligne verticale montre le temps où le débit a changé de 1 mL/h à 2 mL/h.

D'après ces résultats, nous avons remarqué que l'intensité diminuée après l'augmentation de débit. L'effet est clairement relié à la dilution par le plus grand volume du liquide qui passait par le temps. Pour cette raison, nous avons normalisée l'intensité par le débit. Après cette manipulation on n'observe que la libération de fluorophores augment (figure 31). La raison de ce résultat est à cause de l'augmentation de la force de cisaillement appliqué par le plus grand débit.

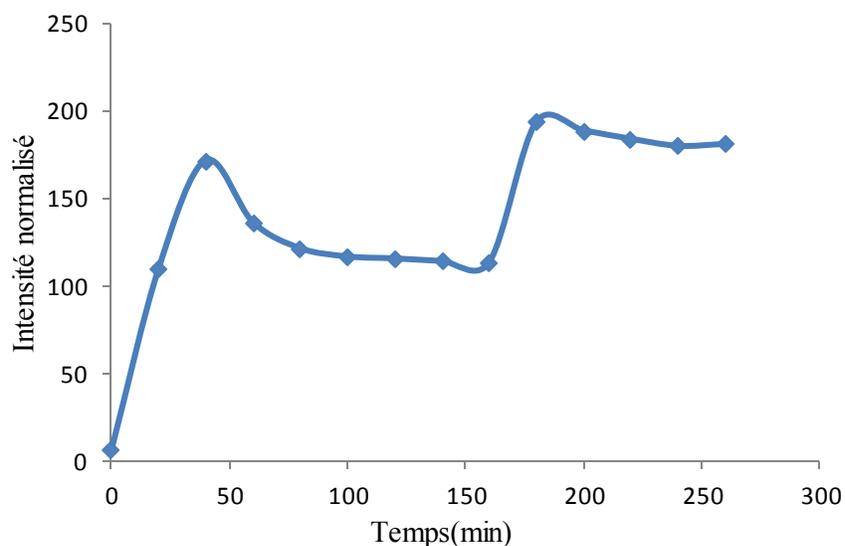


Figure 31 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente au cours du temps normalisé (basé sur les mêmes données dans figure 30).

Nous avons procédé à un deuxième et un troisième lavage sans addition de fluorescéine. La quantité de fluorescéine restante était plus réduite (figure 32). Ce résultat indiquait qu'il y avait une redistribution des molécules de fluorophores dans la couche de NP tel que l'intensité maximale pourrait être supérieure à l'intensité d'équilibre de l'expérience antérieure.

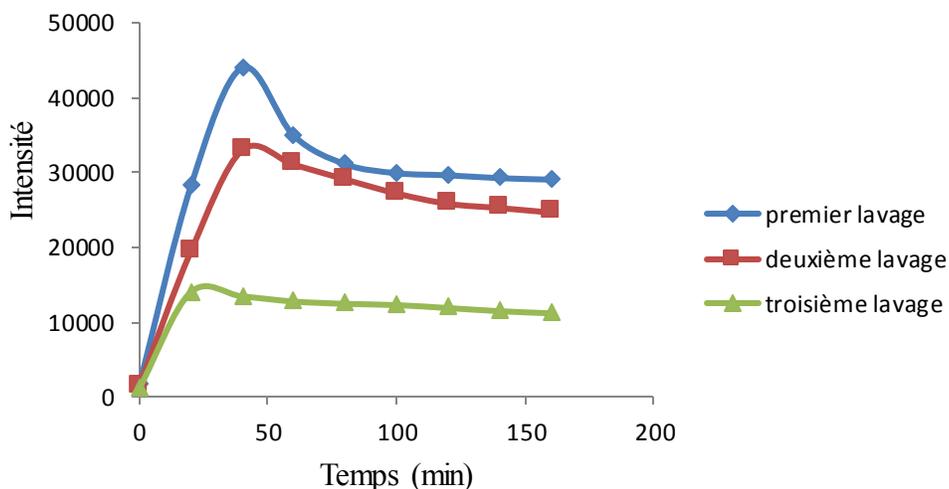


Figure 32 : Variation de l'intensité de la lumière fluorescente correspondante aux trois lavages consécutifs en fonction du temps pour la fluoresceine.

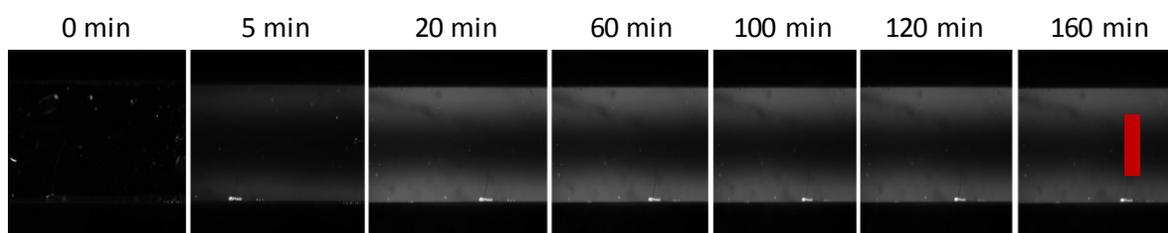
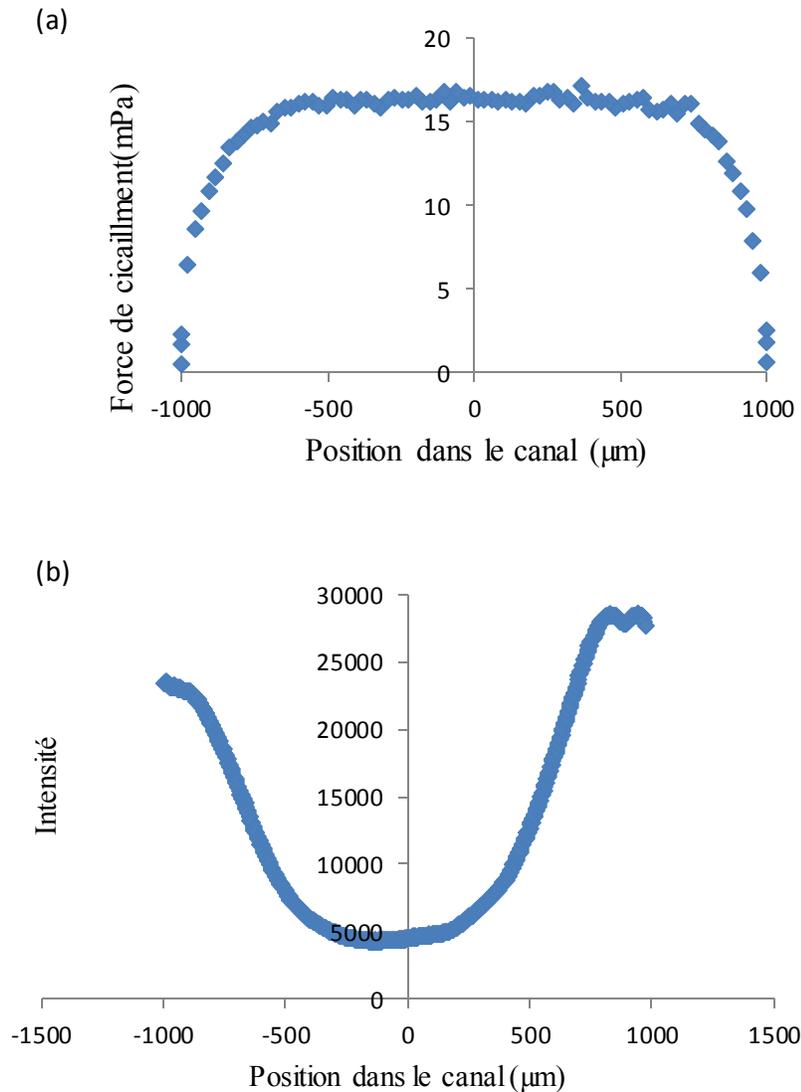


Figure 33 : Photo obtenue sous lumière fluorescente correspondant au troisième lavage de MSNs de la figure 32. La boîte rouge représente la zone de mesure de l'intensité fluorescente.

D'après ces photos, nous avons remarqué une diminution de l'intensité au centre du microcanal, qui était attribuée à un lavage local de la couche plus efficace grâce à la force de cisaillement qui est localement plus forte. La force de cisaillement et les molécules de fluoresceine qui sont relarguées et détectées à la sortie du dépôt sont présentées à la figure 33. Malgré une plus grande libération des molécules au centre du canal, le profil des vitesses d'écoulement localisées au centre de microcanal a diminué la concentration par une dilution plus forte. L'effet final est un plus petit.

Nous avons procédé à une simulation au niveau du microcanal avec le logiciel COMSOL Multiphysics (version 3.5). La contrainte de cisaillement à la paroi a été mesurée le long de la section transversale du canal (400 μm) pour chaque débit. Également, nous avons mesuré l'intensité de lumière sur toute la largeur du microcanal afin que l'on puisse suivre la

variation aussi bien que la force de cisaillement (figure 34) que de l'intensité de lumière fluorescente correspondante, du microcanal MF de hauteur 400 μm .



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure 34 : (a) Force de cisaillement et (b) profil d'intensité en fonction de la position le long de la section transversale du canal. En tout cas, the canal était le meme $h=400 \mu\text{m}$, $w=2000 \mu\text{m}$ avec un débit de liquide appliqué, $Q=1 \text{ mL/s}$.

Pour bien étudier la relation entre la force de cisaillement et l'intensité de la lumière, nous avons utilisé le logiciel de traitement des données GRAMS. La figure 35, représente la variation, de l'intensité de la lumière en fonction de la force de cisaillement. La fluorescéine aura tendance à se localiser préférentiellement aux parois du canal. En effet, les concentrations en fluorescéine les plus importantes ont été détectées plutôt aux extrémités qu'au centre du canal.

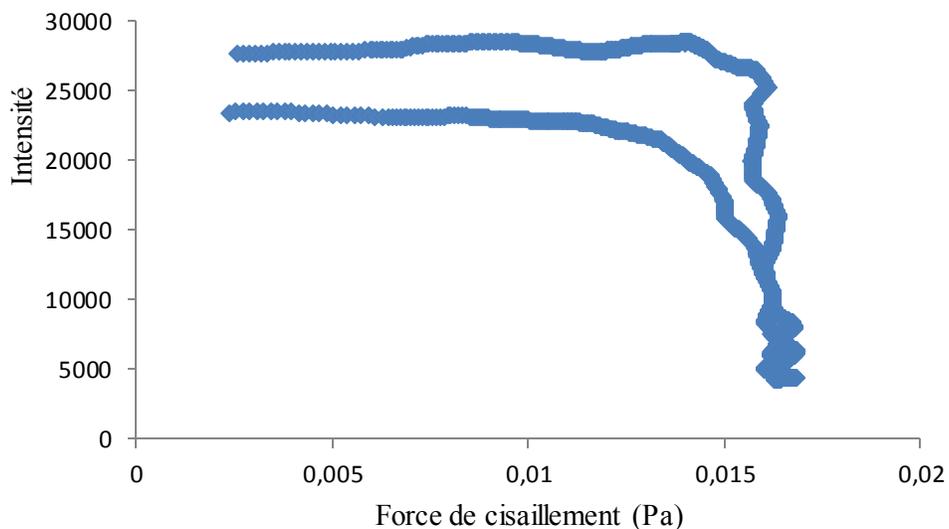


Figure 35 : Variation de l'intensité de la lumière en fonction de la force de cisaillement.

III.4 Analyse de la libération de fluorescéine dans les MSNs vide (sans fonctionnalisation) avec des différents débits

Ce processus de mesure cinétique est basé sur les mêmes étapes excepté que nous avons changé le mode de séchage. Au lieu de sécher chaque fois le dépôt pendant 24 h, le séchage a été obtenu en utilisant une petite pompe à faible débit d'air pendant seulement une demi-heure, après une adsorption de la fluorescéine qui dure deux heures.

D'après ces résultats (figure 36), nous avons remarqué que la valeur maximale de la concentration varie avec le changement de débit. Puisqu'il est dû à l'effet de dilution, lorsqu'on augmente le débit, l'intensité fluorescente diminue, mais au même temps, le relargage des molécules fluorescentes est aussi rapide.

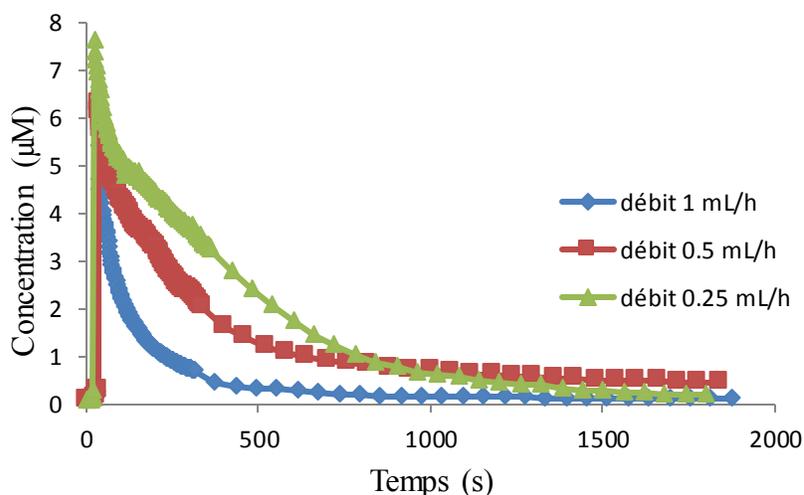


Figure 36 : Évolution de la concentration de la fluorescéine au cours du temps pour chaque débit.

III.5 Mesure de la libération de fluorescéinamine dans les MSNs avec fonctionnalisation avec un débit de 1 mL/h

Dans la partie précédente, nous avons étudié le relargage du fluorophore suite à des simulations avec des différents flux hydrodynamiques seulement pour contrôler l'efficacité de type de MSNs (MCM-48) à adsorber puis libérer le fluorophore sur demande.

Ce système d'administration permet d'imaginer des préceptes utilisant au mieux des agents antimicrobiens pour des travaux futurs. Ces dernières années, les études se sont orientées plus vers l'évolution de nouveaux matériaux pouvant riposter à des excitations externes telles que le pH, la température et la lumière.

III.5.1 Les MSNs sans fonctionnalisation

Nous avons analysé la libération de nouveau fluorophore à partir des NPs mésoporeuses vides (sans fonctionnalisation) avec les différents pH. Celui-ci étant précédé d'une même manière d'analyse que l'ancienne méthode. Ceci, dans le but d'avoir une similitude ainsi qu'une conformité au niveau des résultats obtenus au terme de chaque opération. Aussi, le temps de prise des images pour chaque lavage diminue de 10 min à 2 secondes pour mieux étudier le

phénomène de libération de fluorescéine des sites de nanoparticules de silice mésoporeuse. Les résultats ainsi obtenus sont représentés sur la figure 37.

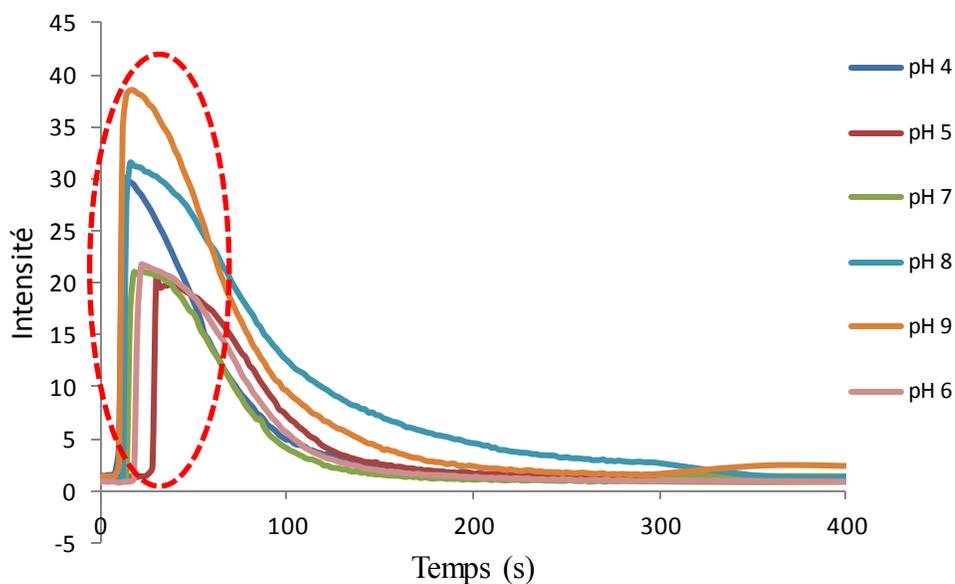


Figure 37 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéinamine) au cours du temps pour chaque solution tampon.

Au début de cette étude, nous avons analysé le relargage de la fluorescéine déposée sur et dans les MSNs ; ceci, tout en mesurant l'intensité mesurée au niveau du canal au cours de chaque lavage (unité arbitraire) en fonction de temps. Dans cette partie, nous avons procédé de façon à affiner davantage nos résultats. Ainsi, au lieu de nous baser sur la mesure de l'intensité de lumière fluorescente du canal en fonction du temps, nous avons opté pour une mesure directe de l'intensité de fluorescéine libérée pour chaque pH dès la sortie du dépôt. Nous avons aussi utilisé la courbe de pH en fonction de l'intensité pour faire une normalisation des données.

La figure 38 représente le mode de libération de fluorescéine de couche de MSNs pour chaque pH. Ces résultats confirment que le relargage est plus important à des pH acides. La raison est que les pHs acides rendent les silanols de la surface de MSNs protonés. Celle-ci paraît effectivement plus facile à drainer de notre MSNs. Mais le relargage ici n'est pas sélectif, car à des pH supérieur ou égal à 8, on dénote un redémarrage très élevé du processus

de relargage de la fluorescéine, et c'est pour ça nous avons essayé de chercher d'autre groupement fonctionnel qui nous pouvons les greffer sur les MSNs.

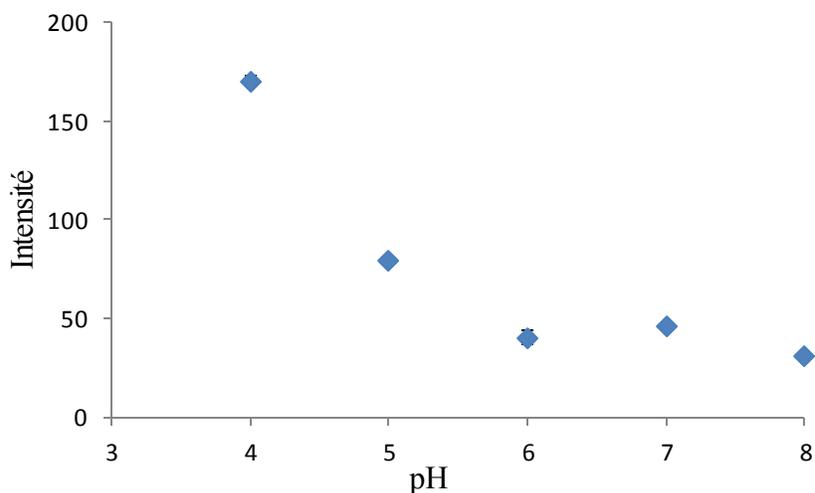


Figure 38 : La variation de l'intensité maximal en fonction pH pour les MSNs non-fonctionnalisés et fluorescéinamine. Barres d'erreurs (plus petites que les marqueurs) étaient fait par l'écarte-type de trois mesures séparées.

III.5.2 Les NPS MSN fonctionnalisés avec NH₂ dans les pores

Pour remédier au phénomène précédent, la solution que nous proposons est de greffer le groupement fonctionnel NH₂ dans les pores de NPs. Par la suite, ces MSNs gardent un bon pourcentage de silanols libres à la surface et en plus on a des amines supplémentaires.

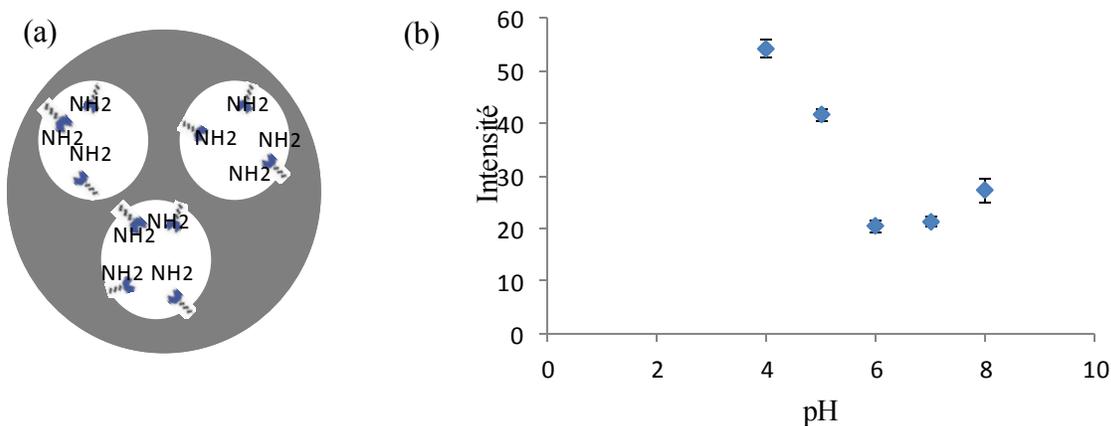


Figure 39 : (a) Le groupement fonctionnel NH₂ se trouve dans les pores de MSN et (b) la variation de maximum de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéinamine) en fonction pH.

On remarque d'après les résultats de la figure 39, que le relargage est toujours très sensible aux pH acides, puis il diminue vers les pH basiques. Ainsi, le relargage s'améliore avec les NPs greffés par le NH_2 par rapport à celle non greffées.

Ces résultats montrent que le relargage est très faible par rapport aux résultats précédents obtenus, ce qui confirme l'absence de silanols libres sur la surface et dans les pores de NPs.

III.5.3 Les NPS MSN fonctionnalisés avec le phosphonates

Le groupement de phosphonate a été greffé sur la surface MSNs par la procédure post-greffage en utilisant une molécule phosphonate de silane : THMP. La procédure de greffe a été réalisée en solution aqueuse, tel que rapporté dans la littérature. Une solution de THMP acide a été préparée en ajustant le pH de THMP à une valeur comprise entre 5 et 6 en ajoutant quelques gouttes de HCl concentré (12N). Ensuite, cette solution a été ajoutée à une suspension aqueuse de nanoparticules pures (10 mg mL^{-1}) et la suspension finale a été reposée pendant une nuit à 100°C .

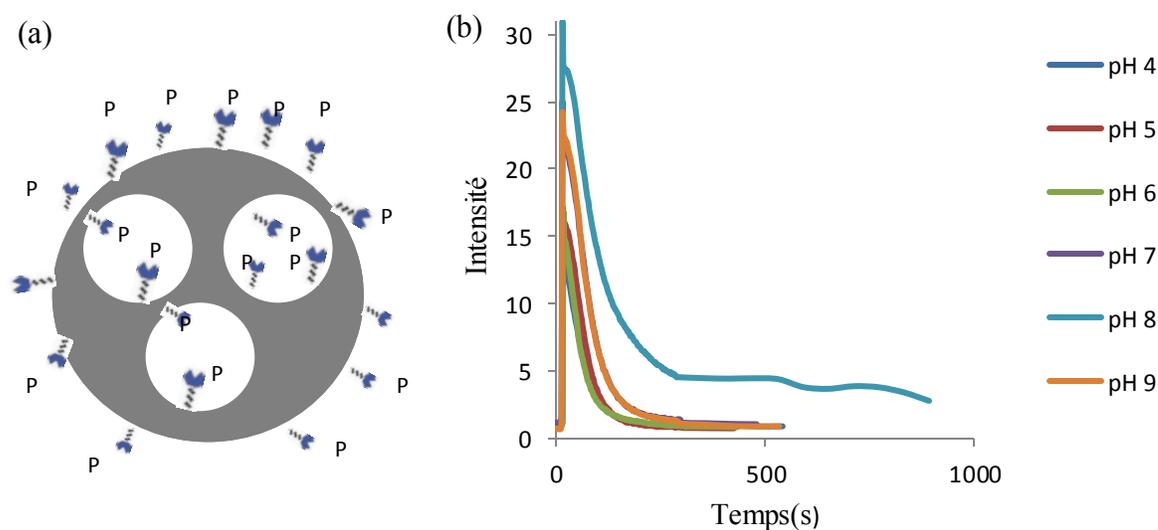


Figure 40 : (a) Le groupement fonctionnel le phosphonate se trouve dans les pores et sur la surface MSNs et (b) évolution de l'intensité de la lumière fluorescente (fluorescéine) au cours du temps pour chaque solution tampon.

Les MSNs fonctionnalisées ont été isolées par centrifugation ($7500G$, 10 min), lavées trois fois avec de l'eau, deux fois avec de l'éthanol et séchées pendant une nuit. Les nanoparticules résultantes sont désignées comme "P-MSN".

D'après les résultats de la figure 41, on remarque un relargage important vers les pH acide (<6) et faible vers les pH basique (pH>7) pour les MSNs fonctionnalisés avec le phosphonate est chargé avec la fluorescéine.

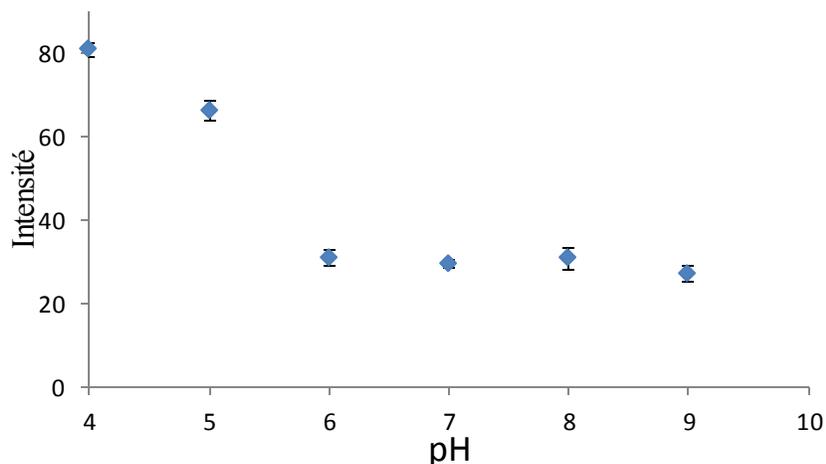


Figure 41 : La variation de maximum de l'intensité de la lumière fluorescente en fonction pH.

Pour mieux comprendre le phénomène de relargage, nous avons tracé un tableau qui montre le point isoélectrique pour chaque molécule et aussi nous avons réalisé les mesures de potentiel Zeta pour les MSNs pur et les MSNs-P. Nous avons trouvé les résultats suivants qui sont représentés à la figure 42.

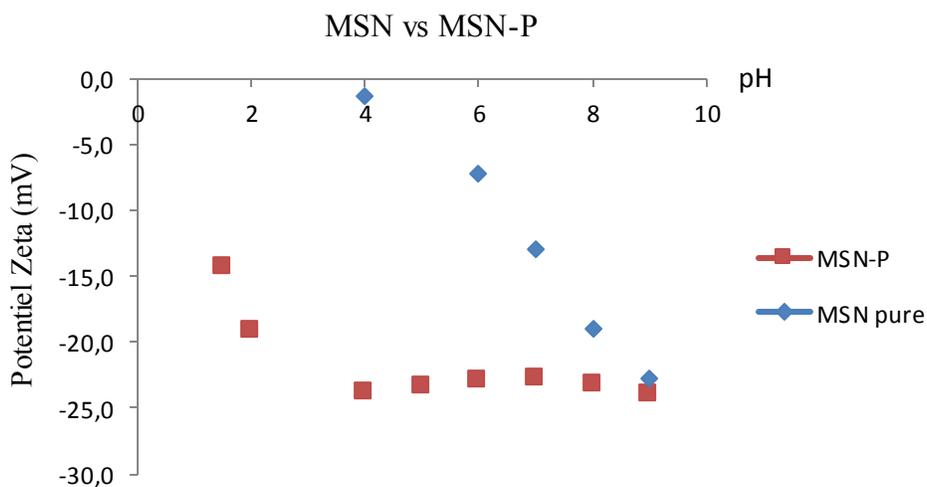


Figure 42 : La variation de potentiel Zeta en fonction de pH.

Un des facteurs importants qui influence la quantité de fluorescéinamine adsorbée est le pH. Diverses études utilisant la silice ont montré que l'absorption de fluorescéinamine, change à un pH autour du son point isoélectrique (PI). La charge est négative au-dessous du PI ou au-dessus du PI. Cela est provoqué par les interactions électrostatiques entre la fluorescéinamine et le MSNs. On prend l'exemple de fluorescéine et la silice fonctionnalisée par le phosphonate. Dans ce cas, le fluorophore a un point isoélectrique entre le pH7 et pH 8. Il est chargé positivement à pH acide. Par contre, la silice fonctionnalisée par le phosphonate est chargée négativement à partir de pH=3. Cela résulte en des forces répulsives (à partir d'un pH supérieur) entre la fluorescéinamine adsorbée sur la surface du matériau (MSNs), et par conséquent en un relargage très important du fluorophore. Ce type de silice favorise donc l'application avec le biofilm.

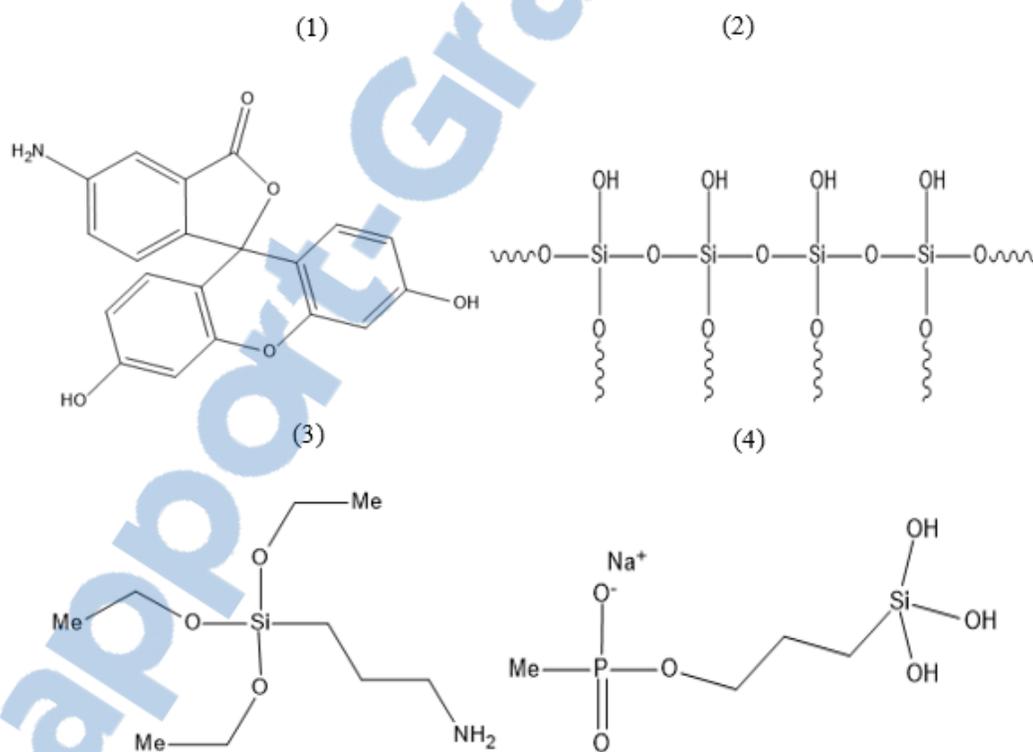


Figure 43 : (1) fluorescéinamine, isomère I (2) la silice (3) (3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES) à $\text{pKa}=8$ (4) 3-(Trihydroxysilyl) propyl méthyl phosphonate monosodium salt solution 50% wt in H_2O à $\text{pKa}=2$

Tableau 4 : Le point isoélectrique pour chaque molécule.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(1) fluorescéine, isomère I	+1	+1	+1	+1	+1	0	0	-2	-2
(2) la silice	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
(3)3-aminopropyltriéthoxysilane	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	0	0
(4)-(trihydroxysilyl) propyl methyl phosphonate monosodium	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

III.5.4 Comparaison de la libération de la fluorescéine entre les MSNs et NPs sans pores

Pour comparer l'effet des pores sur le relargage de fluorescéine que soit dans les sites interstitiels ou dans les pores, nous avons réalisé deux expériences où une solution tamponnée à pH 7 était imposée sur la couche MSN ou NPs sans pores, respectivement. À ce pH, les molécules liées directement à la surface de MSN devraient rester attachées lorsque les autres deviennent solubilisées et éliminées. Le premier pic pour les deux expériences dans la figure 44 était relié à cet effet. Après une certaine période, assez longue et avec un débit d'écoulement assez fort (entre $Q=0.5$ mL/h et 2 mL/h) pour bien éliminer les molécules non-liées aux surfaces, nous avons déclenché la libération de fluorescéine par diminution de pH à 4. Lorsque le pH était changé à 4, nous avons noté une augmentation d'intensité à cause du déclenchement de la libération moléculaire. Dans les deux cas, le comportement était similaire, mais l'effet était plus prononcé pour les MSNs (avec pores) grâce à l'aire de la surface qui était plus grande (et capacité de chargement).

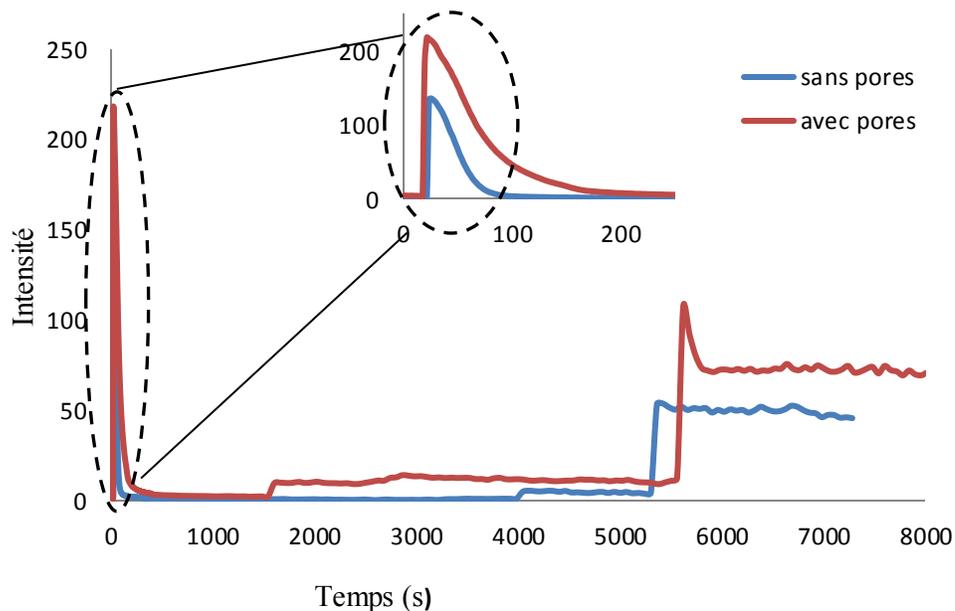


Figure 44 : Comparaison de la variation de l'intensité de la lumière en fonction de temps pour les NPS. La figure agrandie montre la libération initiale des molécules non-liées au MNS. Débit était $Q = 2 \text{ mL/h}$ avec une solution tamponnée à pH 7.

III.5.5 Efficacité en fonction du temps

Pour comprendre l'efficacité du système en fonction du temps, nous avons refait l'expérience décrite en haut plusieurs fois, chaque fois avec un différent délai entre le commencement de l'expérience et le changement du pH de 7 à 4. Le résultat est représenté dans la figure 45 où l'on voit l'augmentation d'intensité dès que le pH est modifié de 7 à 4. C'est évident que le changement à pH 4 provoque une libération rapide des molécules, mais l'efficacité diminue si le système reste exposé au liquide.

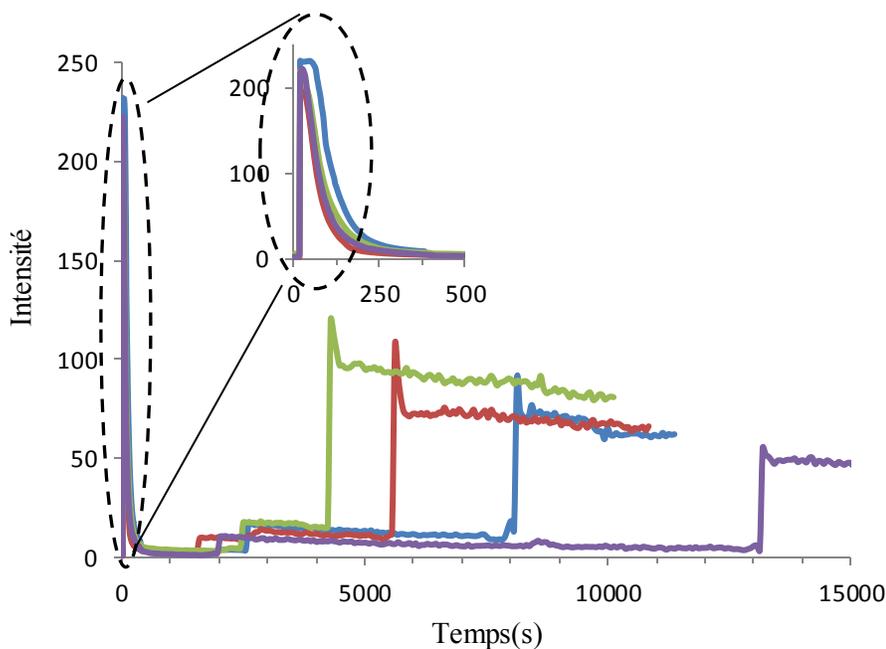
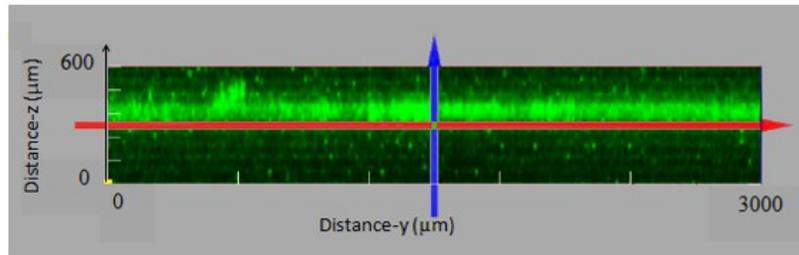


Figure 45 : Évolution de l'intensité de la lumière fluorescente en fonction du temps pour 4 expériences avec un déclenchement de libération avec une solution tamponnée initialement à pH 7 et après pH 4 aux différents temps. La figure agrandie montre la libération initiale des molécules non-liées au MSNs. $Q_{\text{initial}}=2\text{ mL/h}$ pour tout, et a devenu à $Q_{\text{final}}=0,5\text{ mL/h}$ a peu près 2000-3000 s.

III.6 Les mesures de la couche des nano silices obtenues avec le microscope confocal (CLSM)

Il est important de contrôler la hauteur de la couche de NPs pour garder l'espace vide dans le microcanal toujours le même volume et d'avoir des courbes similaires de libération entre les expériences différentes. À l'aide du CLSM, nous avons mesuré l'épaisseur de dépôt de NPs dans le canal microfluidique fabriquée d'être environ de $70\ \mu\text{m}$. Elle était assez reproductible ($\pm 10\ \mu\text{m}$) pour les propositions de développement. La figure 46 montre les résultats d'une coupe transversale et le profil d'intensité correspondant. Nous avons déterminé l'épaisseur par une mesure de la largeur d'une coupe transversale dans la direction-z où la valeur d'intensité moyenne était 25% du maximum, pour un standard de comparaison (figure 46).

(a)



(b)

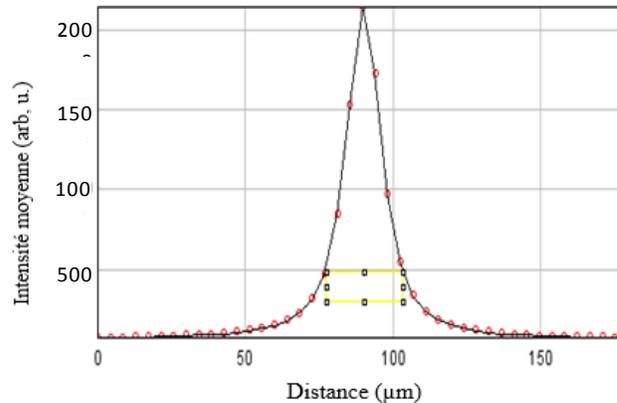


Figure 46 : (a) Image typique d'une coupe transversale de la couche de NPs (sans pores) contenant fluorescéine par CLSM. (b) Mesure d'intensité de fluorescence émis par le dépôt en fonction de la distance verticale par CLSM en direction de la flèche bleue dans le micro canal. La largeur de la boîte jaune montre l'épaisseur du dépôt.

Nous avons répété la fabrication de plusieurs couches avec différents NPs, certains avec et certains sans des pores. Figure 47 montre deux résultats typiques. On remarque que, malgré l'intensité plus élevée pour la couche composée par des NPs poreux en comparaison de celles composées par NPs non-poreux, les largeurs des courbes de profil en direction-z, qui correspondent aux épaisseurs des couches, étaient les mêmes (67 µm pour la couche des NPs avec pores 71 µm pour la couche des NPs sans pores).

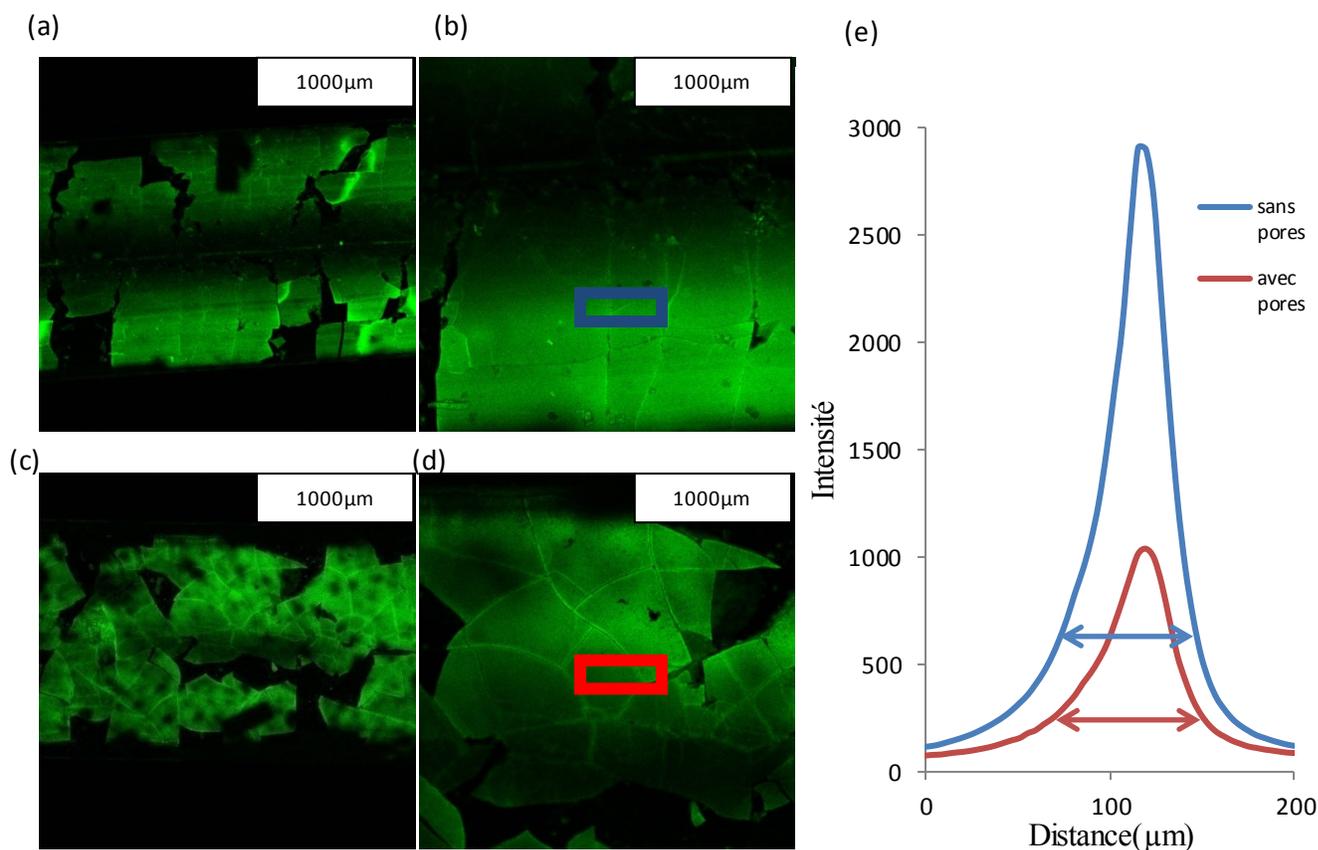


Figure 47 : Photos obtenues au CLSM de NPs avec pores (a, b) et sans pores (c, d) avec un objectif 4x (résolution-Z = 54 μm) (a,c) et objectif 10x (résolution-Z = 8.55 μm) (b,d). Les deux rectangles (bleu et rouge) marquent la zone où l'épaisseur a été mesurée. (e) Le profil d'intensité suivant l'axe z pour des couches composée par NPs non-poreux (rouge) et des couches composées par NPs poreux (bleu). Les flèches présentent la distance entre la couche supérieure et inférieure.

III.7 Vérification du séchage total de MSNs après l'adsorption de fluorophore en utilisant la Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR)

Dans un premier lieu, nous avons placé sur l'accessoire ATR une quantité de NPs seule, puis nous avons ajouté une dose de la fluorescéine soluble dans une solution tampon à pH 8 afin de garder l'ensemble afin qu'il sèche pendant 24 heures. Nous avons obtenu les résultats représentés dans la figure 48. Ces spectres montrent bien la présence de la bande de l'eau vers 3500 cm^{-1} qui disparaît pendant le processus de séchage. Cela nous a permis de prouver qu'après une injection de la fluorescéine sur le dépôt de NPs, il y a un séchage presque complet du solvant.

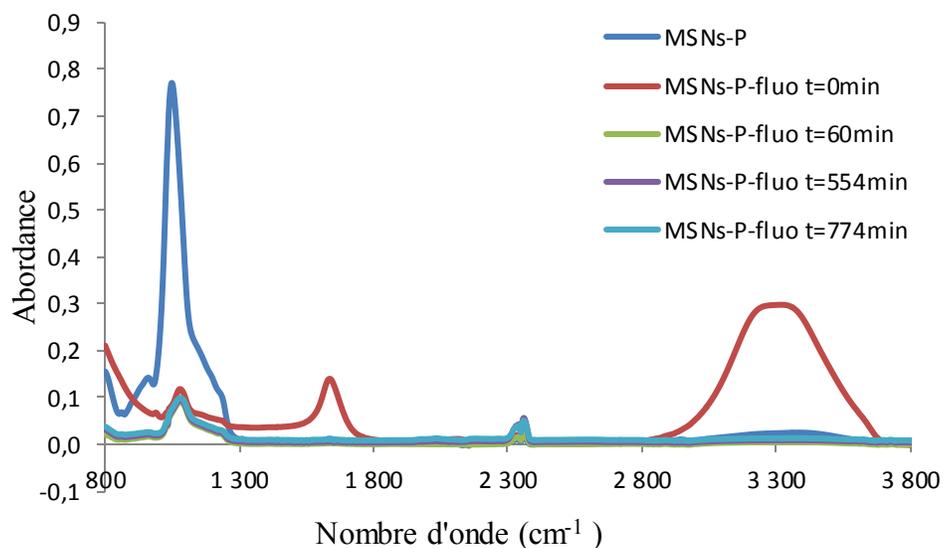


Figure 48 : Evolution des spectres d'absorbance vibrationnelle avec le temps de séchage pour les MSNs fonctionnalisées par le phosphonate (MSNs-P, bleu) et les MSNs fonctionnalisées par le phosphonate avec la fluorescéineamine (MSNs-P-fluo). Temps de séchage est indiqué. Dans tous les cas, les MSNs étaient dispersés dans une solution aqueuse (pH 8).

III.8 Étude de biocompatibilité de dépôt MSNs et le biofilm

Cette étude consiste à déposer une couche de NPs sur une extrémité de notre microcanal, puis à faire croître un biofilm sur ce dépôt de NPs pour savoir l'évolution de croissance d'un biofilm. Les résultats sont représentés sur la figure 49. Ces résultats montrent une biocompatibilité entre le biofilm et le dépôt de MSNs à travers la croissance du biofilm obtenue qui est analogue à celle observée pour le microcanal vide (sans dépôt). Par la suite, ces nanoparticules démontrent également une excellente biocompatibilité, ce qui favorise pour le futur une fonctionnalisation par des agents antimicrobiens qui permettront un relargage déclenché en présence du biofilm sous l'influence d'un pH acide.

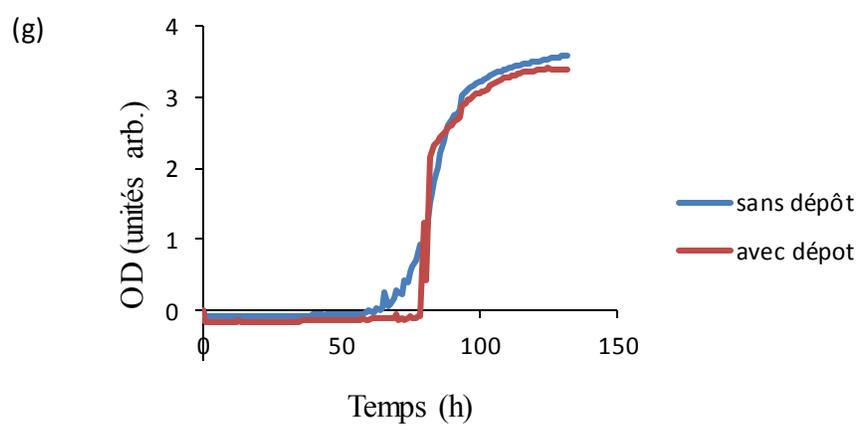
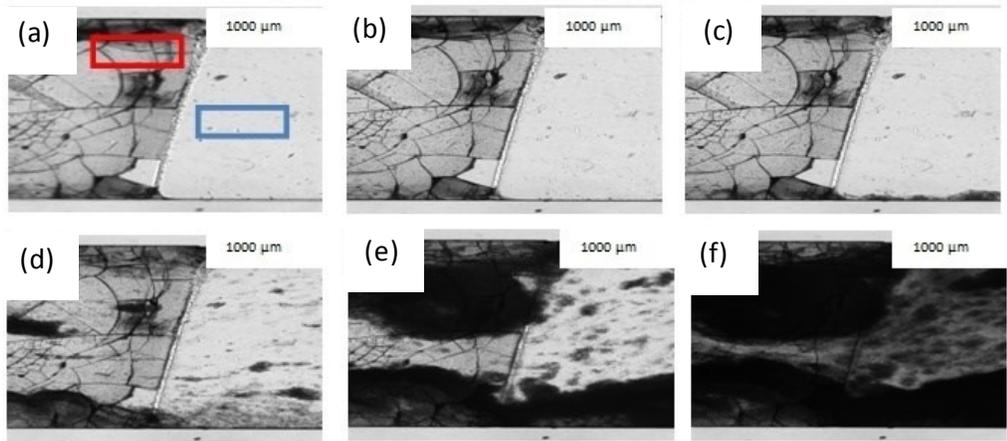


Figure 49 : Des images microscopiques de croissance d'un biofilm au cours de temps (a) 0 h, (b) 43 h, (c) 76 h, (d) 81 h, (e) 93 h et (f) 116 h. (g) La densité optique mesurée dans le canal vide sans dépôt de NPS (rectangle bleu) et dans le dépôt de NPS (rectangle rouge) pour suivre la croissance de biofilm avec un débit $Q = 0,4 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

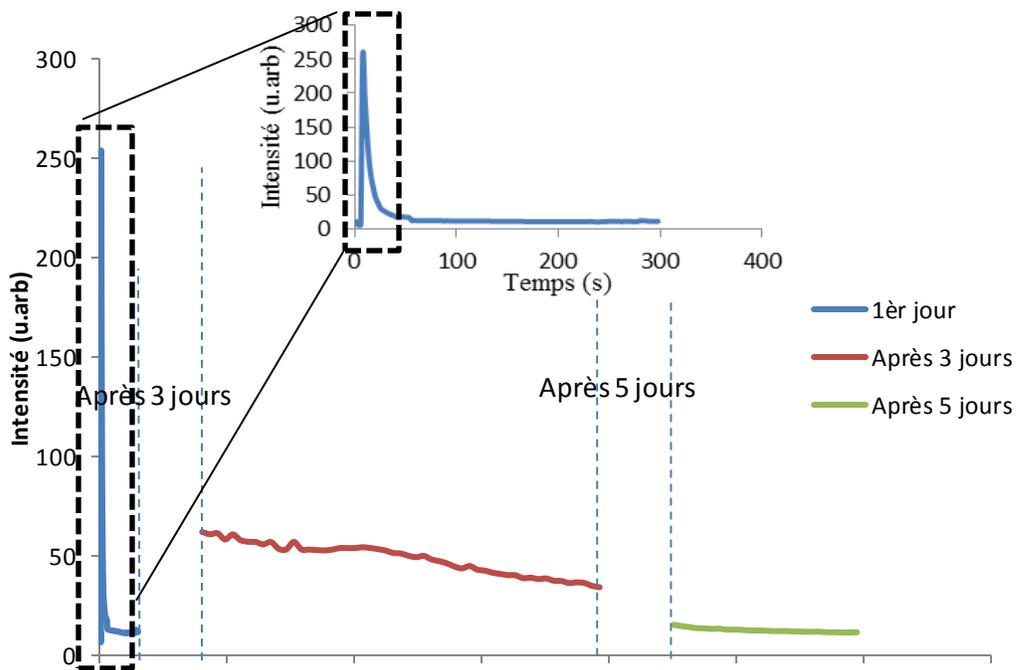


Figure 50 : Variation d'intensité de fluorescence de la fluorescéine en fonction de temps de croissance de biofilm suite à un changement de medium LB sans glucose à un LB avec glucose durant 6 jours.

D'après ces résultats, nous avons constaté que suite à un changement de milieu de culture LB avec glucose, notre dépôt a libéré les molécules fluorescentes avec un changement de pH. Donc nous avons conclu que le dépôt de NPs fonctionnalisés avec le phosphonate est sensible pour des pH acides. Par la suite, ces nanoparticules démontrent également une excellente biocompatibilité, ce qui favorise pour la future une fonctionnalisation par des agents antimicrobiens qui ont permis un relargage déclenché en présence du biofilm sous l'influence d'un pH acide.

IV. Conclusion

Nous avons étudié le relargage d'agents bioactifs à partir de NPs MSNs immobilisées sur une surface au niveau de laquelle nous avons fait croître un biofilm. Le revêtement de MSNs permet en effet, un relargage d'agents bioactifs qui se déclenche sous l'influence d'un flux hydrodynamique.

Ces travaux de recherche trouvent leurs intérêts, notamment dans la production de molécules acides lors de la fermentation d'un biofilm qui va mener à une baisse locale du pH à 1-2 unités, ce qui devrait déclencher le relargage d'espèces antimicrobiennes séquestrées au sein des particules de silice. L'élimination du biofilm par les agents antimicrobiens devrait en principe stopper le relargage, jusqu'à une prochaine attaque acide. Un tel système de relargage sur demande présente un fort intérêt pour les implants médicaux ou des applications industrielles durant lesquelles l'apparition de biofilm est récurrente.

Comme les biofilms croissent dans des environnements soumis à des flux, nous avons testé les performances des couches en conditions hydrodynamiques au sein de microcanaux. Dans un premier temps, la stabilité des couches de MSNs a été examinée en conditions hydrodynamiques, puis nous avons suivi les cinétiques de relargage déclenché sous l'effet de différents flux hydrodynamiques et de diverses conditions de flux (sans biofilm).

Nous avons choisi des MSNs de type MCM-48 pour leur structure poreuse 3D. En effet, leurs pores (3.2 nm) étaient suffisamment larges pour accommoder des agents antimicrobiens, leur surface spécifique étant suffisamment élevée ($\sim 1300 \text{ m}^2/\text{g}$) pour l'inclusion d'une grande quantité de substances bioactives. De plus, leur taille est bien adaptée pour faire un dépôt uniforme sur tout le canal ou seulement au milieu de celui-ci.

Dans un premier lieu, nous avons développé une méthode pour faire une couche de nano silice au milieu du microcanal MF, qui adhère bien à la surface du canal. Dans un second temps, nous avons utilisé la fluorescéine pour simuler le relargage des espèces bioactives. Celle-ci a été déposée par injection sur le dépôt de MSNs dans le la microfluidique. Après application de différents flux hydrodynamiques, nous avons pu suivre la désorption de fluorescéinamine au cours du temps. Les résultats obtenus ont montré que le relargage commence par la quantité déposée sur la surface du dépôt MSNs. Ensuite, après un certain temps de latence, on assiste à un redémarrage de libération de fluorescéine enfermée aussi

bien dans les sites interstitiels que dans les pores de MSNs. Enfin, nous avons pu montrer la biocompatibilité du dépôt de NPS à travers la croissance du biofilm qui est analogue à celle observée au niveau du microcanal vide. Comme perspective à ce travail, cette étude apportera de nouvelles méthodes pour produire rapidement des matériaux viables pour de futures applications, par exemple des surfaces antimicrobiennes « intelligentes » pour le domaine de la santé (implants, surfaces antibactériennes dans les hôpitaux, etc.), des surfaces fonctionnelles autonettoyantes (dans les systèmes de refroidissement de filtration) ou bien pour des revêtements de pointes pour les transports. Les nouveaux systèmes pourront être multifonctionnels et polyvalents en plus d'être utilisables à la fois dans le domaine de la santé ou pour des applications environnementales. Le projet permettra aussi l'obtention de connaissances fondamentales sur les particules pour le relargage d'agents antimicrobiens et les interfaces nanostructures-biofilm. De plus on peut imaginer de différentes expériences d'avancer un nouveau domaine de recherche dans l'équipe de Greener où le biofilm est dosé par de différentes molécules et l'effet sur leurs Propriétés mécaniques est mesuré [54, 55]. Même, les expériences avec plusieurs capteurs pourraient utilisées pour affecter d'autres mesures *in situ*. [56, 57]

Références Bibliographiques

1. Callow, M.E. and R.L. Fletcher, THE INFLUENCE OF LOW SURFACE-ENERGY MATERIALS ON BIOADHESION - A REVIEW, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1994, **34**, 333-348.
2. Davies, D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 2003, **2**, 114-122.
3. Mamaeva, V., J.M. Rosenholm, L.T. Bate-Eya, L. Bergman, E. Peuhu, A. Duchanoy, L.E. Fortelius, S. Landor, D.M. Toivola, M. Linden, and C. Sahlgren, Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Targeted Inhibition of Notch Signaling in Cancer, *Molecular Therapy*, 2011, **19**, 1538-1546.
4. Bouchoucha, M., R. C-Gaudreault, M.-A. Fortin, and F. Kleitz, Mesoporous Silica Nanoparticles: Selective Surface Functionalization for Optimal Relaxometric and Drug Loading Performances, *Advanced Functional Materials*, 2014, **24**, 5911-5923.
5. Meng, H., M. Liong, T. Xia, Z. Li, Z. Ji, J.I. Zink, and A.E. Nel, Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and P-Glycoprotein siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line, *ACS Nano*, 2010, **4**, 4539-4550.
6. Langsrud, S., M.S. Sidhu, E. Heir, and A.L. Holck, Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **51**, 283-290.
7. Flemming, H.-C. and J. Wingender, The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 2010, **8**, 623-633.
8. Gan, Q., X. Lu, Y. Yuan, J. Qian, H. Zhou, X. Lu, J. Shi, and C. Liu, A magnetic, reversible pH-responsive nanogated ensemble based on Fe₃O₄ nanoparticles-capped mesoporous silica, *Biomaterials*, 2010, **32**, 1932-1942.
9. Meng, H.A., M. Liong, T.A. Xia, Z.X. Li, Z.X. Ji, J.I. Zink, and A.E. Nel, Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and P-Glycoprotein siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line, *ACS Nano*, 2010, **4**, 4539-4550.
10. Rosenholm, J.M., A. Meinander, E. Peuhu, R. Niemi, J.E. Eriksson, C. Sahlgren, and M. Linden, Targeting of Porous Hybrid Silica Nanoparticles to Cancer Cells, *ACS Nano*, 2009, **3**, 197-206.
11. Slowing, I.I. and V.S.Y. Lin, Pore enlarged mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane impermeable proteins, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2007, **233**, 186-186.
12. Xia, T.A., M. Kovochich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J.I. Zink, and A.E. Nel, Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs, *ACS Nano*, 2009, **3**, 3273-3286.
13. Allison, D.G., The biofilm matrix. *Biofouling*, 2003, **19**, 139-150.
14. Liu, Y. and Q. Zhao, Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry*, 2005, **117**, 39-45.

15. Han, H.M., R. Gopal, and Y. Park, Design and membrane-disruption mechanism of charge-enriched AMPs exhibiting cell selectivity, high-salt resistance, and anti-biofilm properties, *Amino Acids*, 2016, **48**, 505-522.
16. Peulen, T.-O. and K.J. Wilkinson, Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**, 3367-3373.
17. Karatan, E. and P. Watnick, Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, **73**, 310.
18. Uhlich, G.A., P.H. Cooke, and E.B. Solomon, Analyses of the red-dry-rough phenotype of an Escherichia coli O157 : H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**, 2564-2572.
19. Bester, E., G.M. Wolfaardt, N.B. Aznaveh, and J. Greener, Biofilms' Role in Planktonic Cell Proliferation, *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, **14**, 21965-21982.
20. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, 1999, **284**, 1318-1322.
21. Majdi, N., B. Mialet, S. Boyer, M. Tackx, J. Leflaive, S. Bouletreau, L. Ten-Hage, F. Julien, R. Fernandez and E. Buffan-Dubau. The relationship between epilithic biofilm stability and its associated meiofauna under two patterns of flood disturbance. *Freshwater Science*. 2008, **31**, 38-50.
22. Monroe, D., Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *Plos Biology*, 2007, **5**, 2458-2461.
23. Gashti, M.P., J. Asselin, J. Barbeau, D. Boudreau, and J. Greener, A microfluidic platform with pH imaging for chemical and hydrodynamic stimulation of intact oral biofilms. *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 1412-1419.
24. Gallien, S., F. Sordet, and A. Enache-Angoulvant, Treatment of catheter-related candidemia. *Journal De Mycologie Medicale*. 2007, **17**, 42-49.
25. Goller, C.C. and T. Romeo, Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms*, 2008, **322**, 37-66.
26. Stickler, D.J., Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Clinical Practice Urology*, 2008, **5**, 598-608.
27. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, **2**, 95-108.
28. Le Gentil, C., Y. Sylla, and C. Faille, Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures, *Journal of Food Engineering*, 2010, **96**, 37-42.
29. F.A.C.B., M., Bacterial Biofilm, 2014 [cited 2016 25 avril]; Available from: <http://www.slideshare.net/FernandezC41/biofilm-ex-34791777>.
30. Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel, and P. Lejeune, Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**, 5993-6002.
31. Anderl, J.N., M.J. Franklin, and P.S. Stewart, Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44**, 1818-1824.

32. Silencieux, F., M. Bouchoucha, O. Mercier, S. Turgeon, P. Chevallier, F. Kleitz, and M.A. Fortin, Mesoporous Silica Nanoparticles under Sintering Conditions: A Quantitative Study. *Langmuir*, 2015, **31**, 13011-13021.
33. Simovic, S., D. Losic, and K. Vasilev, Controlled drug release from porous materials by plasma polymer deposition, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 1317-1319.
34. Alothman, Z.A., A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials*, 2012, **5**, 2874-2902.
35. Song, K., J. Guan, Z. Wang, C. Xu, and Q. Kan, Post-treatment of mesoporous material with high temperature for synthesis super-microporous materials with enhanced hydrothermal stability, *Applied Surface Science*, 2009, **255**, 5843-5846.
36. Slowing, I.I., B.G. Trewyn, and V.S.Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 8845-8849.
37. Sinn, R.N., *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology. Reference & User Services Quarterly*, 2005, **44**, 257-258.
38. Wang, L.S., L.C. Wu, S.Y. Lu, L.L. Chang, I.T. Teng, C.M. Yang, and J.A.A. Ho, Biofunctionalized Phospholipid-Capped Mesoporous Silica Nanoshuttles for Targeted Drug Delivery: Improved Water Suspensibility and Decreased Nonspecific Protein Binding., *ACS Nano*, 2010, **4**, 4371-4379.
39. Xia, T., M. Kovochich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J.I. Zink, and A.E. Nel, Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano*, 2009, **3**, 3273-3286.
40. Popat, A., S.B. Hartono, F. Stahr, J. Liu, S.Z. Qiao, and G.Q. Lu, Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*, 2011, **3**, 2801-2818.
41. Laprise-Pelletier, M., M. Bouchoucha, J. Lagueux, P. Chevallier, R. Lecomte, Y. Gossuin, F. Kleitz, and M.-A. Fortin, Metal chelate grafting at the surface of mesoporous silica nanoparticles (MSNs): physico-chemical and biomedical imaging assessment. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, **3**, 748-758.
42. Guillet-Nicolas, R., A. Popat, J.-L. Bridot, G. Monteith, S.Z. Qiao, and F. Kleitz, pH-Responsive Nutraceuical Mesoporous Silica Nanoconjugates with Enhanced Colloidal Stability, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, **52**, 2318-2322.
43. Zhang, J., S. Yan, D. Yuan, G. Alici, N.T. Nguyen, M.E. Warkiani, and W.H. Li, Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 10-34.
44. Spearing, S.M., Materials issues in microelectromechanical systems (MEMS), *Acta Materialia*, 2000, **48**, 179-196.
45. Kim, J., H.-D. Park, and S. Chung, Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation. *Molecules*, 2012, **17**, 9818-9834.
46. Spearing, S.M., *Materials issues in microelectromechanical systems (MEMS)*, *Acta Materialia*, 2000, **48**, 179-196.
47. Maltbie, C., I. Papautsky, S. van den Hoogenhof, D. Eddington, B. Gale, J.-W. Choi, G. Walker, Expanding the Introduction of Microfluidics through a Problem-Based Laboratory Course to Multiple Engineering Disciplines at Five Universities,

- in 2010, *IEEE Frontiers in Education Conference*. [5673414]
DOI: 10.1109/FIE.2010.5673414
48. Paquet-Mercier, F., N.B. Aznaveh, M. Safdar, and J. Greener, A Microfluidic Bioreactor with in Situ SERS Imaging for the Study of Controlled Flow Patterns of Biofilm Precursor Materials, *Sensors*, **13**, 14714-14727.
 49. Shoji, S. and M. Esashi, *MICROFLOW DEVICES AND SYSTEMS. Journal of Micromechanics and Microengineering*, 1994, **4**, 157-171.
 50. Schwarz, M., J. Franz, M. Reimann, The Future is MEMS Design Considerations of Microelectromechanical Systems at Bosch, *22nd International Conference Mixed Design of Integrated Circuits & Systems (Mixdes)*, 2015, 177-180.
 51. Aznaveh, N.B., M. Safdar, G. Wolfardt, and J. Greener, Micropatterned biofilm formations by laminar flow-templating. *Lab on a Chip*, 2014, **14**, 2666-2672.
 52. Macfarlane, S. and J.F. Dillon, Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract, *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **102**, 1187-1196.
 53. Abgrall, P. and A.M. Gue, Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, **17**, R15-R49.
 54. M. Parvinezadeh Gashti, J. Bellavance, O. Kroukamp, G. Wolfardt, S. M. Taghavi, J. Greener, Live-streaming: Time-lapse video evidence of novel streamer formation mechanism and varying viscosity, *Biomicrofluidics*, 2015, **9**, 041101.
 55. F. Paquet-Mercier, M. Parvinezadeh Gashti, J. Bellavance, S. Mohammad Taghavi, Through thick and thin: a microfluidic approach for continuous measurements of biofilm viscosity and the effect of ionic strength, *Lab Chip*, 2016, DOI: 10.1039/C6LC01101B
 56. J. Greener, E. Tumarkin, M. Debono, C-H. Kwan, M. Abolhasani, A. Günther, E. Kumacheva, Development and applications of a microfluidic reactor with multiple reconfigurable probes, *Analyst*, 2012, **137**, 444 - 450.
 57. F. Paquet-Mercier, N. Babaei Aznaveh, M. Safdar, J. Greener, A microfluidic bioreactor with in situ SERS imaging for the study of controlled flow patterns of biofilm precursor materials, *Sensors*, 2013, **13**, 14714-14727 .