

Chapitre 4 : Utilisation de la spectroscopie infrarouge et de la microscopie confocale pour l'étude des premières étapes de croissance.

4.1 Introduction

Les biofilms sont une forme de vie impliquée dans une multitude de processus naturels et industriels. Que ce soit pour les problèmes qu'ils engendrent comme les infections, la dégradation des structures et la résistance bactérienne ou pour leurs bienfaits comme leurs rôles dans différentes niches écologiques, la bioremédiation des eaux usées ou la production d'énergie. Il est important de bien comprendre les facteurs affectant leur croissance et leur stabilité. Puisque les différentes étapes de croissance sont complexes il est nécessaire d'utiliser plusieurs techniques pour les caractériser. Par exemple, les mesures de concentration en oxygène donnent des informations sur le métabolisme et le transport dans les biofilms [7]. Les propriétés mécaniques sont aussi variables pendant la croissance et ont été rapportées auparavant dans la littérature [23, 26, 62]. Les mesures d'impédance sur des biofilms de *Pseudomonas sp.* ont récemment montré une augmentation de la biomasse au fond d'un microcanal au début de la croissance suivie d'une diminution [52]. Ces mesures donnent des informations précises, mais nécessitent la corroboration avec d'autres techniques permettant d'observer la composition du biofilm et sa structure. Pour ce faire, nous utiliserons la spectroscopie infrarouge et la microscopie confocale.

Différents types de microscopie sont rapportés dans la littérature. La microscopie en champ clair et la microscopie à fluorescence sont les plus utilisées. La première technique permet de suivre de manière globale la croissance. La seconde technique permet d'observer plus spécifiquement certaines composantes du biofilm. En utilisant différents marqueurs fluorescents pouvant se lier à des biomolécules spécifiques ou étant exprimées par les bactéries dans certaines conditions, la

structure, distribution des bactéries et les phénotypes retrouvées dans le biofilm peuvent être identifiés [71, 77]. Deux types de marqueurs fluorescents sont utilisés en microscopie à fluorescence. Les protéines fluorescentes comme la GFP (protéine fluorescente verte) exprimées par des bactéries sont utiles pour observer les bactéries sans avoir à ajouter de composé pendant la croissance du biofilm. Des molécules fluorescentes attachées à des molécules pouvant cibler sélectivement certaines biomolécules sont aussi utilisées. Par exemple, les polysaccharides de la matrice extracellulaire peuvent être ciblées à l'aide de lectines marquées avec une molécule fluorescente [108]. La microscopie électronique à balayage a aussi été utilisée afin de mieux observer la structure d'un biofilm, incluant les bactéries et la matrice extracellulaire, à différentes étapes de son développement, mais nécessite la fixation des échantillons [28]. Par conséquent, elle ne permet pas le suivi dans le temps d'un échantillon. Afin d'avoir un contraste suffisant pour l'observation en microscopie électronique, le biofilm est généralement traité avec une solution de glutaraldéhyde et de formaldéhyde puis exposé à des métaux lourds et à des nanoparticules d'or. Ces composés sont ensuite réduits avec une solution d'acide ascorbique ou de glucose [109]. Bien que ces étapes soient cruciales pour obtenir des informations précises à haute résolution sur les biofilms, elles empêchent le suivi dans le temps de l'échantillon et posent le risque de modifier sa structure.

La microscopie confocale à balayage laser a permis plusieurs avancées importantes dans la recherche sur les biofilms [76, 77]. Puisque cette technique est basée sur la microscopie à fluorescence, elle offre les mêmes avantages que cette dernière. L'utilisation d'une source laser collimatée ainsi qu'un sténopé avant le détecteur et un mécanisme permettant de balayer le faisceau sur l'échantillon permet de résoudre les différents plans XY et d'avoir une résolution dans ce plan qui atteint la limite de diffraction. La microscopie confocale est donc utile pour étudier les biofilms puisqu'elle permet de bien caractériser leur structure tridimensionnelle à haute résolution. En utilisant plusieurs lasers, il est possible de détecter plusieurs fluorophores en même temps en CLSM et donc de suivre simultanément deux biomolécules ou processus biochimiques dans le biofilm en temps réel. Pour ce qui

est de l'évolution dans le temps, cela peut être rendu possible par l'utilisation de molécules fluorescentes qui n'endommagent pas les bactéries ou qui sont produites par ces dernières.

Quelques limites sont reliées aux techniques de microscopie. Afin de mieux observer les microstructures, il faut faire des mesures à haute résolution. Les objectifs à haute magnification utilisés pour les expériences en microscopie confocale ont toutefois le désavantage d'avoir une distance de travail courte et un champ de vision restreint. Comme le biofilm dans le microcanal est plus grand que le champ de vision de l'objectif, il est important de s'assurer que l'information soit représentative. Les méthodes en microscopie se concentrent principalement sur la résolution spatiale de différents objets en se basant sur leurs différents contrastes. Bien que le contraste puisse être augmenté en ajoutant des marqueurs fluorescents, la différenciation entre les différentes biomolécules peut être difficile.

Les méthodes spectroscopiques ont l'avantage de résoudre les différents composés chimiques à partir de leur signature spectrale. Plus particulièrement, la spectroscopie infrarouge peut être utilisée pour suivre la composition en biomolécules du biofilm pendant sa croissance. Plus spécifiquement, la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (IR-ATR) a été utilisée dans la littérature avec des cellules d'écoulement [31, 32]. Afin de relier les effets observés avec ce qui se produit dans le biofilm, les auteurs ont utilisé différents ratios de bandes pour évaluer le métabolisme et la proportion de bactéries par rapport à la matrice extracellulaire [31]. Ainsi le ratio entre la bande amide II qui est reliée aux protéines avec la bande d'élongation phosphate, qui est principalement reliée aux acides nucléiques, a été suivi. Il a été observé que le ratio entre ces deux bandes est similaire pour les bactéries planctoniques et sessiles et qu'il est plus élevé lorsque les bactéries sont dans la phase de croissance rapide. Cela reflète le fait que l'activité métabolique des bactéries est élevée à ce moment. L'aire de la bande amide II quant à elle peut servir d'indicateur de l'accumulation de la biomasse pendant la croissance du biofilm [31].

Ces deux techniques seront ensuite utilisées afin de regarder l'effet de la méthode d'inoculation sur la croissance des biofilms. La nature de l'inoculum a un effet important sur la phase de latence ainsi que sur la croissance initiale du biofilm. Par exemple, des cellules attachées réversiblement à la surface peuvent commencer à croître et se diviser plus lentement que leur vitesse maximale et cela dépend de leur état dans l'inoculum. Certaines études portant sur le métabolisme des biofilms indiquent que l'environnement présent dans l'inoculum a un impact sur la formation des biofilms. Ainsi, lorsque l'inoculum provient de l'effluent d'un biofilm existant la formation d'un biofilm est plus rapide [100, 110]. Le changement de phénotype des bactéries entre planctonique et sessile est un phénomène biologique qui prend du temps à se produire. Ainsi si le métabolisme des bactéries correspond déjà au type sessile ou est près de celui-ci, les premières étapes de croissance sont plus rapides. Cela démontre l'intérêt de bien contrôler l'état dans lequel sont les bactéries qui serviront à inoculer le biofilm dans la région étudiée.

Dans ce chapitre, la microscopie confocale ainsi que la spectroscopie infrarouge seront utilisées pour étudier la croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp. CT07* dans un dispositif microfluidique puisque ces deux techniques sont complémentaires. De plus, deux méthodes d'inoculation des bactéries seront évaluées. La première, l'inoculation directe, consiste à injecter directement les bactéries dans le microcanal. La seconde, l'inoculation par un biofilm en amont, consiste à faire croître un biofilm dans un tube placé avant le microcanal. Lorsque ce biofilm est dans le stade désiré, on fait circuler son effluent dans le dispositif microfluidique pour l'inoculer. Dans ce cas, il est attendu que les bactéries provenant du biofilm en amont aient un métabolisme propice à la formation d'un biofilm. De plus, pour les problèmes de bioencrassement, il est fréquent qu'un biofilm situé en amont provoque la contamination du reste du système fluidique. Les expériences d'inoculation par un biofilm en amont visent donc aussi à mimer ce processus.

4.2 Suivi de la croissance par spectroscopie infrarouge

Afin de mieux comprendre les mécanismes liés aux premières étapes de la croissance des biofilms, la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée a été utilisée. Tel que décrit dans la section expérimentale, le système est sondé sur une profondeur de 1 à 2 μm . Cette épaisseur se rapproche du diamètre des bactéries de la famille *Pseudomonas*. Par conséquent, on peut considérer qu'on étudie seulement la première couche de bactéries ainsi que la partie de la matrice extracellulaire assurant l'adhésion au substrat. La Figure 4-1 montre le spectre infrarouge en réflexion totale atténuée d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après 60 heures de croissance.

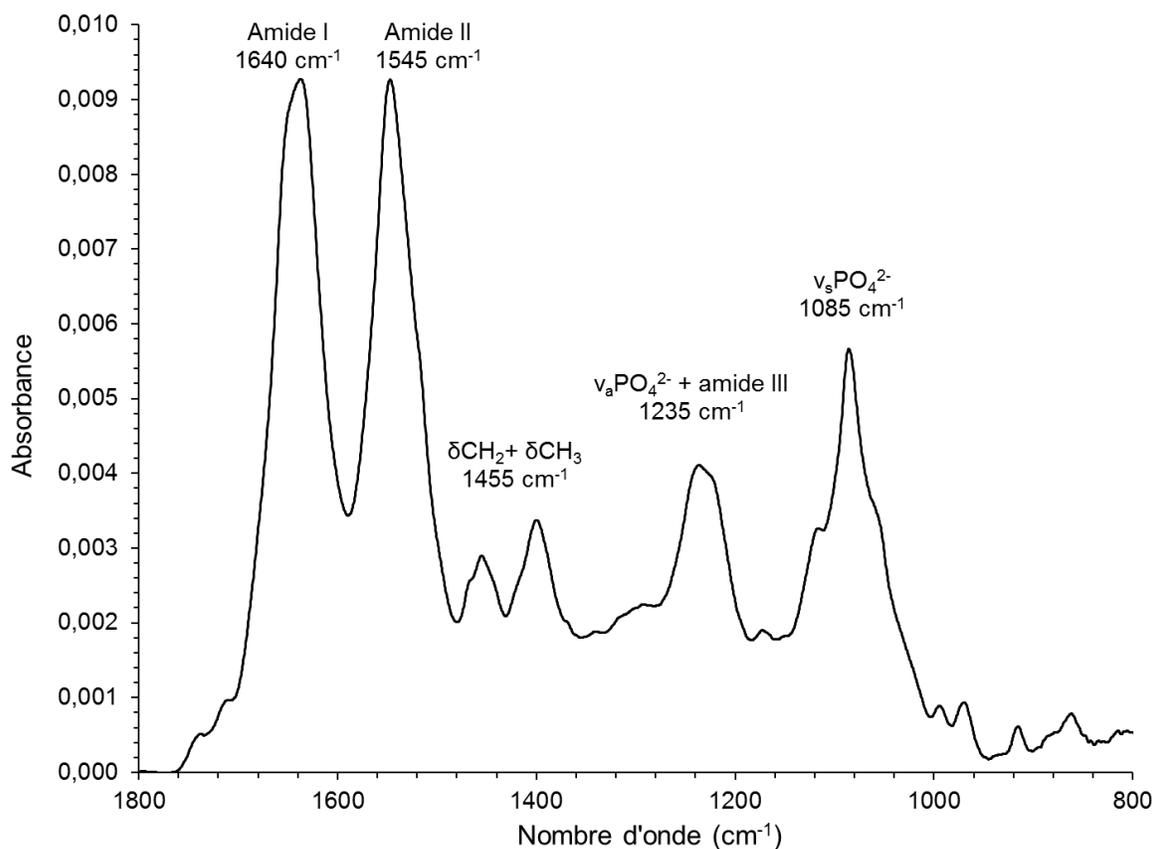


Figure 4-1 : Spectre infrarouge d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 sur le cristal ATR en diamant après 60 heures. Le spectre du milieu de culture (AB modifié avec 10 mM de citrate de sodium comme source de carbone) a été soustrait afin de mieux voir les bandes du biofilm.

Tableau 4-1 : Principales bandes observées dans le spectre infrarouge en réflexion totale atténuée d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CTO7 après 60 heures de croissance avec leurs attributions et les principales biomolécules qui y sont reliées [32, 111].

Position (cm ⁻¹)	Attribution	Composé relié
1640	Amide I	Protéines
1545	Amide II	Protéines
1455	$\delta\text{CH}_2 + \delta\text{CH}_3$	Lipides
1315-1280	Amide III	Protéines
1235	$\nu_a\text{PO}_4^{2-}$	Acides nucléiques
1085	$\nu_s\text{PO}_4^{2-}$	Acides nucléiques
1060	$\nu_s\text{C-O-C}$	Polysaccharides

On observe différentes bandes en infrarouge attribuables aux différents constituants du biofilm (voir Tableau 4-1 pour le résumé des attributions). Les protéines peuvent être observées à partir des bandes amide I, amide II et amide III autour de 1640, 1545 et 1315-1280 cm⁻¹, respectivement [31, 112]. Dans la littérature, les protéines sont considérées comme étant situées principalement à l'intérieur des bactéries et par conséquent un bon marqueur pour suivre l'évolution de la quantité de bactéries dans le biofilm [31, 32]. Plusieurs bandes permettent de caractériser les acides nucléiques, l'ADN et l'ARN. Les bandes à 1235 cm⁻¹ ($\nu_a\text{PO}_4^{2-}$) et à 1085 cm⁻¹ ($\nu_s\text{PO}_4^{2-}$) sont toutes les deux caractéristiques des acides nucléiques [32]. L'ADN et l'ARN sont tous les deux représentés par la bande à 1115 cm⁻¹ ($\nu_s\text{CC}$). Dans un biofilm, ces composés se retrouvent principalement dans les bactéries. Les polysaccharides sont principalement associés à la bande $\nu_s\text{C-O-C}$ à 1060 cm⁻¹. Les polysaccharides sont un des constituants principaux de la matrice extracellulaire et favorisent aussi l'adhésion des biofilms avec les surfaces. Ils jouent un rôle important

dans les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire [30]. On les retrouve aussi dans la membrane des bactéries.

Tel qu'observé dans le spectre du biofilm à la Figure 4-1, la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ des acides nucléiques à 1085 cm^{-1} a deux épaulements. Afin de mieux caractériser cette bande ainsi que les autres composantes entre 950 et 1160 cm^{-1} , une déconvolution spectrale a été effectuée (Figure 4-2). Cela permettra aussi de vérifier les contributions relatives des différentes bandes présentes et de voir si la contribution de la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ est suffisamment importante pour être utilisée pour suivre les acides nucléiques.

La Figure 4-2 montre la décomposition spectrale des spectres IR-ATR du biofilm entre 1160 et 950 cm^{-1} . Cette région contient à la fois des bandes associées aux acides nucléiques et aux polysaccharides. La décomposition spectrale a été faite en utilisant un minimum de bandes permettant de bien définir l'ensemble des spectres acquis pendant la croissance. Le nombre de bandes ainsi que leur position ont été choisies à partir de la forme du spectre et à l'aide des informations tirées de la littérature [32]. Les paramètres initiaux de largeur de bande ont été choisis à partir de la forme du spectre du biofilm. Tous les paramètres de décomposition spectrale ont été testés sur des spectres à différentes étapes de croissance afin de s'assurer de leur validité. Lors de la décomposition spectrale, la contrainte sur la position et la largeur à mi-hauteur des bandes est, respectivement, de plus ou moins 2 et 10 cm^{-1} autour du paramètre initial. L'absorbance des bandes n'est pas contrainte. La bande principale observée dans cette région est la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ à 1085 cm^{-1} correspondant principalement aux acides nucléiques. Il est important de noter que les phospholipides contribuent aussi à cette bande. Ces derniers sont principalement situés dans la membrane. À 1118 cm^{-1} on observe la bande $\nu_s\text{CC}$ de l'ADN et de l'ARN. Pour ces composés, il y a aussi deux bandes à 993 et 970 cm^{-1} . Les modes de vibration de ces bandes sont plus complexes. Les polysaccharides sont représentés par deux bandes à 1060 cm^{-1} ($\nu_s\text{COC}$) et à 1045 cm^{-1} ($\nu\text{OH} + \delta\text{CO}$). La déconvolution spectrale permet de voir que la bande majoritaire est bien la bande

$\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ à 1085 cm^{-1} et que cette dernière compte pour la majorité de l'intensité à cette longueur d'onde. Des déconvolutions à plusieurs périodes dans le temps indiquent que c'est aussi le cas aux différentes périodes pendant la croissance du biofilm. Par conséquent, il est possible d'utiliser son absorbance pour suivre l'évolution de la composition en acides nucléiques dans le biofilm pendant sa croissance par spectroscopie IR-ATR.

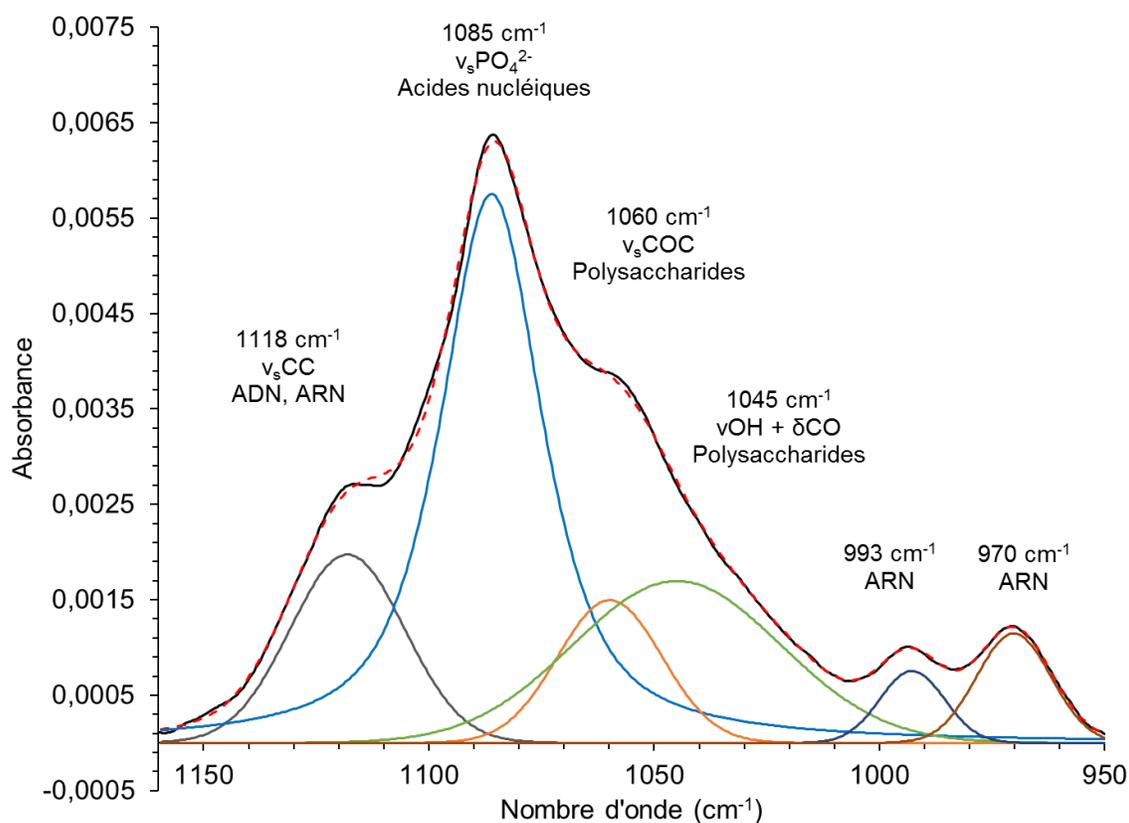


Figure 4-2 : Décomposition spectrale du spectre IR-ATR du biofilm montré à la Figure 4-1 entre 1160 et 950 cm^{-1} . Cette région comprend notamment la bande $\nu_s\text{CC}$ de l'ADN et ARN à 1118 cm^{-1} , la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ à 1085 cm^{-1} des acides nucléiques et la bande $\nu_s\text{C-O-C}$ des polysaccharides à 1060 cm^{-1} .

La Figure 4-3 montre l'évolution des différentes bandes du biofilm pendant la croissance. Dans ce cas, aucune période de latence où les bandes seraient très peu

intenses et ne changeraient pas d'intensité n'est observée. Pour d'autres biofilms et plus particulièrement ceux obtenus par inoculation directe, il y a une période de latence. Une croissance exponentielle qui se traduit en une augmentation rapide de l'intensité de toutes les bandes associées au biofilm est observée au début du développement du biofilm (Figure 4-3). La croissance se fait ensuite plus lentement, puis on observe une diminution de l'absorbance de certaines bandes. Plus particulièrement, les bandes amide I et amide II suivent cette tendance. On voit qu'un peu après une journée de croissance, leur intensité diminue. Le même comportement est observé pour les bandes $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ et $\nu_a\text{PO}_4^{2-}$ principalement associées aux acides nucléiques. Cela indique qu'après cette période de quelques heures, il y a moins de bactéries à la surface du cristal de diamant ou ces dernières deviennent moins actives. Puisque les protéines et les acides nucléiques sont principalement localisés dans les bactéries, si les bactéries s'éloignaient de la surface ou deviennent moins actives, on observerait une diminution de leur absorbance.

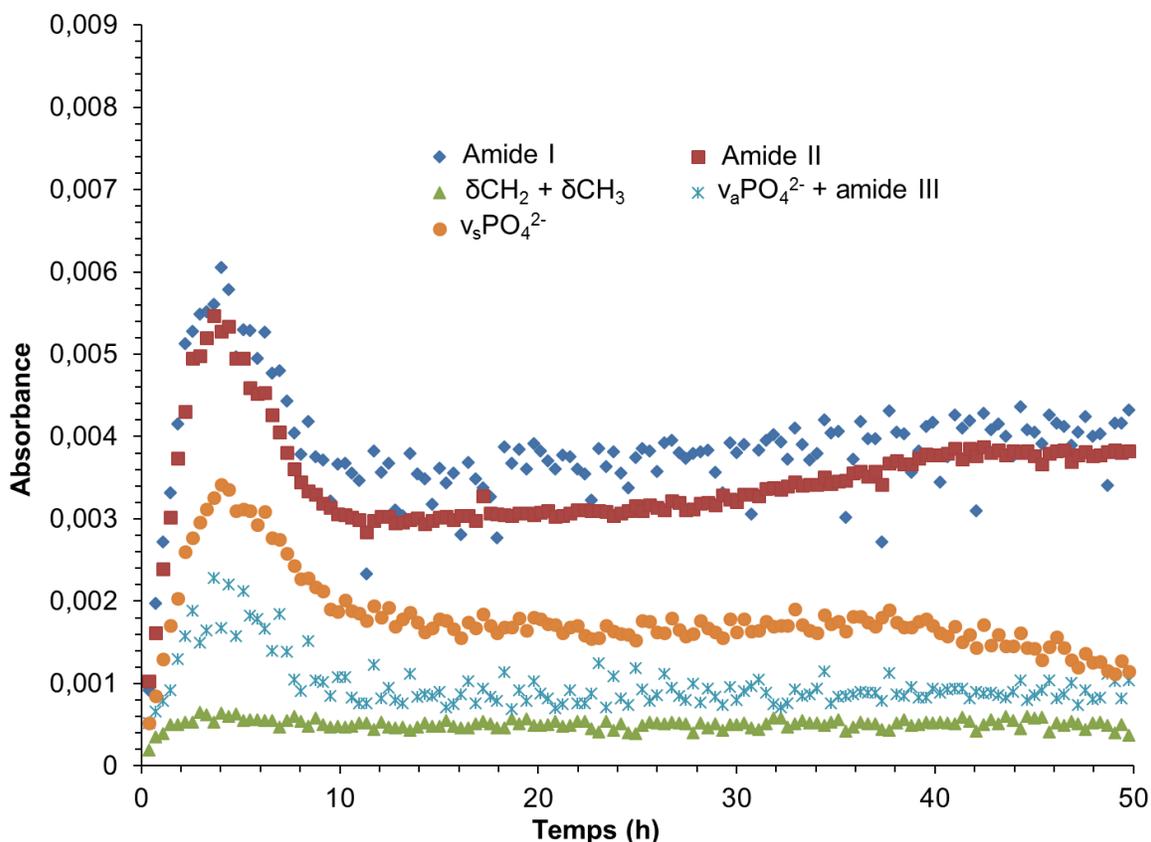


Figure 4-3 : Absorbance pour différentes bandes en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée pendant la croissance d'un biofilm (amide I, amide II, $\delta\text{CH}_2 + \delta\text{CH}_3$, $\nu_a\text{PO}_4^{2-} + \text{amide III}$ et $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ (losange bleu, carré rouge, triangle vert, étoile bleue et cercle orange, respectivement). Dans le spectre infrarouge, ces bandes se retrouvent respectivement à 1640, 1545, 1455, 1235 et 1085 cm^{-1} . L'attribution spectrale des bandes se retrouve au Tableau 4-1 et le spectre correspondant est à la Figure 4-1.

Alors que le suivi de l'absorbance des différentes bandes est révélateur de la croissance du biofilm, le ratio des bandes donne des informations importantes sur la composition relative en biomolécules. Le ratio entre la bande amide II (1545 cm^{-1} ; protéines) et la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ (1085 cm^{-1} ; acides nucléiques) est intéressant puisque ces deux biomolécules sont importantes pour le biofilm et les bactéries qui en font partie (Figure 4-4). Pour suivre les protéines, la bande amide II est préférable à la bande amide I puisque cette dernière a moins de recouvrement avec la bande δHOH à 1654 cm^{-1} de l'eau. Cette bande est retirée du spectre en faisant la

soustraction spectrale du milieu de culture pendant le traitement des données. Les valeurs d'absorbance pour la bande amide II sont toutefois plus précises puisqu'elles sont moins affectées par cette procédure. On observe à la Figure 4-4 que le ratio entre la bande amide II des protéines (1545 cm^{-1}) et la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ des acides nucléiques (1085 cm^{-1}) diminue pendant les 8 premières heures de croissance. Il augmente ensuite pendant tout le reste du développement du biofilm avec une croissance plus rapide après 35 heures. Les premières 8 heures correspondent à la croissance exponentielle. La diminution du ratio indique que la quantité des protéines augmente plus lentement que les acides nucléiques. Il est important de considérer qu'en valeur absolue les deux types de molécules augmentent pendant cette période (Figure 4-3). Cela pourrait être relié à une division cellulaire rapide des bactéries. Après la phase de croissance rapide, le ratio augmente, ce qui indique un changement de métabolisme important à partir de 8 heures pour ce biofilm [32].

Une restructuration du biofilm après la phase de croissance rapide serait cohérente avec ces observations. D'abord, la diminution de l'absorbance pour les bandes principales associées aux protéines et aux acides nucléiques (Figure 4-3) pourrait être reliée à un déplacement des bactéries vers les couches supérieures du biofilm. Les mesures en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée en ATR diamant sont représentatives des premiers deux microns au-dessus de la surface du cristal de diamant. Tout ce qui est au-delà de cette limite n'est pas échantillonné. L'augmentation du ratio entre les bandes associées aux protéines et aux acides nucléiques indiquerait alors que les bactéries et la matrice extracellulaire qui reste à la surface du cristal ATR ont une proportion de plus en plus importante de protéines par rapport aux acides nucléiques. Des mesures par microscopie confocale permettront d'observer directement les bactéries pendant la croissance du biofilm. La résolution dans l'axe Z (profondeur du biofilm) permettra d'observer l'évolution du biofilm directement au fond du microcanal (comme en spectroscopie IR-ATR) et dans les parties supérieures.

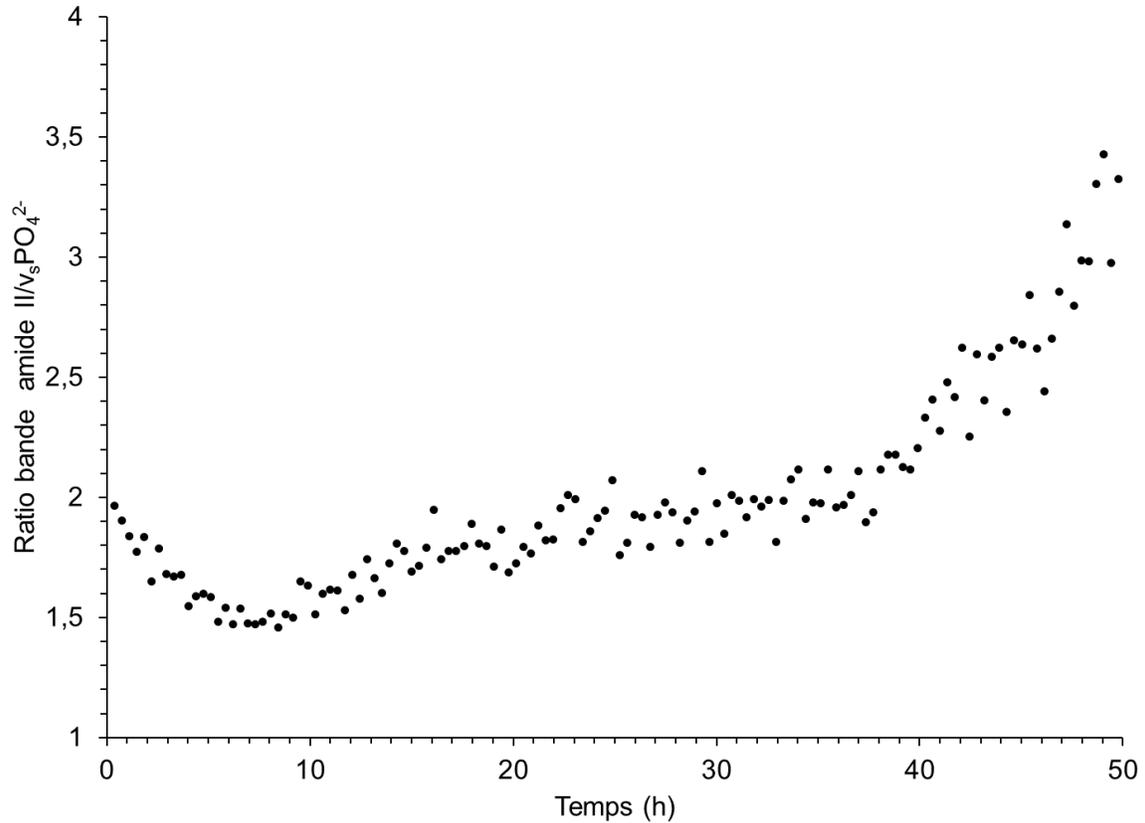


Figure 4-4 : Ratio entre la bande amide II et la bande $v_sPO_4^{2-}$ pendant la croissance du biofilm. La bande amide II est principalement associée aux protéines alors que la bande $v_sPO_4^{2-}$ est principalement reliée aux acides nucléiques.

4.3 Absence de photoblanchiment pour les conditions d'acquisition utilisées en microscopie confocale

En microscopie à fluorescence, le photoblanchiment du fluorophore cause une diminution dans le temps de l'intensité. Le fluorophore pour les mesures effectuées dans le cadre de ces travaux est la protéine fluorescente verte (GFP) qui est produite par les bactéries. Dans le cas où les bactéries seraient endommagées lors de l'exposition à la source de lumière, la GFP serait moins exprimée ce qui causerait aussi une diminution de l'intensité observée [113]. La GFP est toutefois connue pour être plutôt résistante au photoblanchiment [73]. Afin de vérifier que les conditions

d'acquisition utilisées pour les expériences ne causent pas de photodommages, une expérience préliminaire a été réalisée. Pour un même biofilm, différentes régions d'intérêt ont été observées avec deux objectifs différents pendant la croissance. Pour l'objectif 40x, une région de dimension 317 par 317 μm^2 est analysée. Pour l'objectif 10x, la région analysée fait 1272 x 1272 μm^2 . L'échantillon est positionné afin qu'il y ait un recouvrement entre les deux. De cette manière, une partie du biofilm est échantillonné lors des deux acquisitions. Le photoblanchiment du fluorophore ou des photodommages aux bactéries provoquerait une décoloration pour la partie du biofilm scannée deux fois par le laser. Des projections des empilements confocaux ont été faites afin de comparer les acquisitions faites avec l'objectif 10x (Figure 4-5 A) et l'objectif 40x (Figure 4-5 B). On observe dans la région marquée par un rectangle pointillé (région correspondant aux deux acquisitions) pour l'image acquise avec l'objectif 10x qu'il n'y a pas de différence d'intensité et qu'on ne voit pas la transition avec le reste. Par conséquent, on peut considérer que le biofilm ne subit pas de photodommages dans les conditions utilisées pour les présentes expériences. Le même biofilm a été analysé à chaque heure en microscopie confocale de la même manière pendant la croissance et aucun photodommage n'a été observé.

Les mesures d'intensité sont intéressantes pour le suivi de la croissance puisque cette mesure est rapide et simple à faire. En effet, il suffit de mesurer la valeur de pixel moyenne sur une tranche d'un empilement confocal pour obtenir l'information nécessaire. En revanche pour les mesures d'aire, il faut déterminer une valeur de pixel limite pour la binarisation, éliminer le bruit de fond et finalement évaluer la proportion de la surface couverte par les bactéries. La mesure d'aire occupée possède toutefois des avantages sur la mesure d'intensité. Bien qu'il n'y ait pas de photoblanchiment des bactéries pendant la croissance, il est possible que dans certain cas l'intensité observée ne soit pas représentative de la biomasse provenant des bactéries. Les mesures faites avec les bactéries exprimant la GFP sont dépendantes du métabolisme des bactéries. Ainsi, si elles sont moins actives, moins de GFP sera produite par les bactéries et leur intensité sera plus faible. Pour les

mesures d'aire, cet effet peut être compensé puisque la valeur de pixel limite peut être ajustée de manière à bien inclure les bactéries qui sont moins fluorescentes.

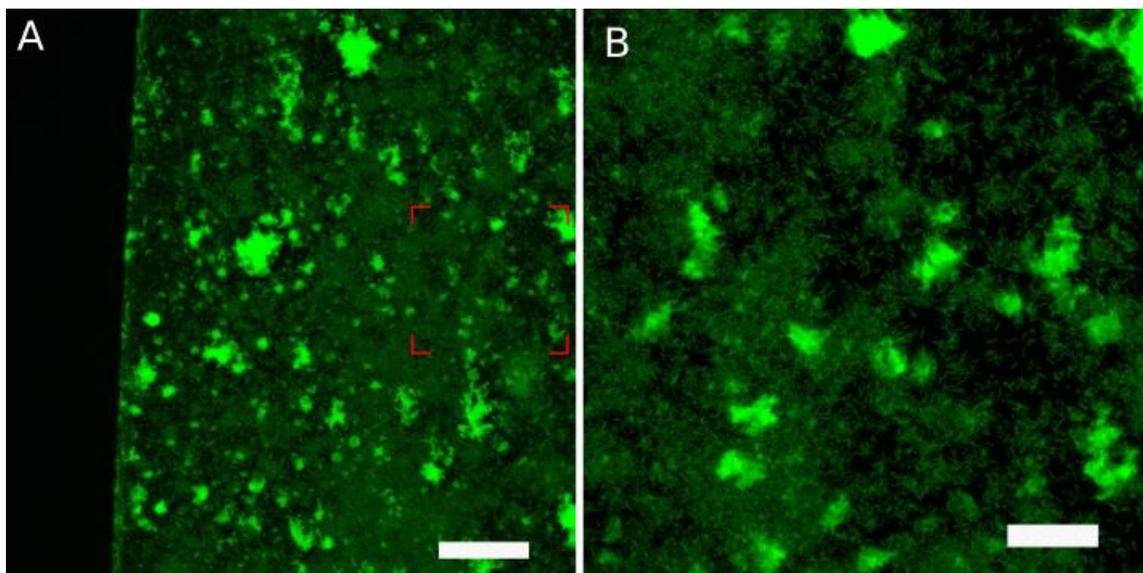


Figure 4-5 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 20 μm de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CTO7 après 70 heures de croissance pour l'objectif A) 10x et B) 40x. L'encadré en rouge dans A) indique la région mesurée pour B). Afin d'éviter de masquer la zone où les deux régions se recouvrent, l'encadré en A) est légèrement plus grand que la région mesurée en B). Les barres d'échelle mesurent 200 et 50 μm pour A) et B), respectivement.

4.4 Suivi de la croissance par microscopie confocale à balayage laser

Afin de mieux comprendre les effets observés par la spectroscopie infrarouge, la microscopie confocale a été utilisée. Cette technique permet d'étudier la croissance des bactéries. En effet, à partir de cette technique, il a été possible de faire l'acquisition d'images confocales en trois dimensions afin de caractériser la répartition et l'abondance de bactéries dans le temps. Les expériences réalisées en microscopie confocale sont toujours faites en parallèle avec les mesures en

spectroscopie infrarouge. La même solution de bactérie est utilisée pour l'inoculation pour les deux expériences, ce qui permet de s'assurer que les bactéries auront le même comportement pour les deux expériences.

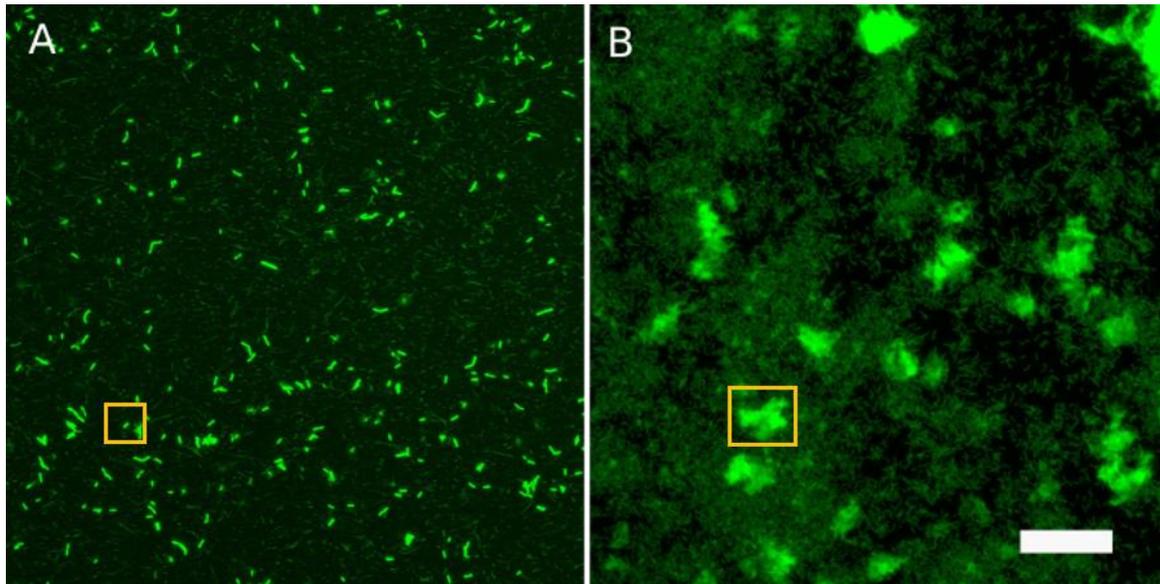


Figure 4-6 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 18 μm de l'empilement confocal du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après 12 (A) et 70 (B) heures de croissance. Les images ont été acquises avec un objectif 60x à immersion. Les deux encadrés jaunes indiquent les régions qui seront analysées pour la Figure 4-7. La barre d'échelle mesure 50 μm .

La Figure 4-6 montre la projection dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 au début et à la fin de la croissance. On observe qu'au début, il n'y a que des bactéries isolées adhérant sur la surface de la lamelle de verre. Cela correspond à l'attachement initial. Par la suite, on observe une formation de structures autour des premières bactéries. Cela correspond à la formation de microcolonies et à l'attachement irréversible. Ensuite, le biofilm devient plus haut et la lamelle de verre est complètement couverte de bactéries, ce qui correspond aux phases de croissance exponentielles et de maturation. À partir de cette étape, on n'observe plus de bactéries individuelles. Après cette étape, les changements dans

la structure du biofilm sont moins marqués. La rupture du biofilm n'est pas observée pendant la durée d'observation des biofilms lors de ces expériences.

La microscopie confocale permet de faire des mesures dans l'axe Z du biofilm dans le canal microfluidique pendant sa croissance. La Figure 4-7 présente les profils d'intensité pour le même biofilm après 12 heures et après 70 heures. Pour le biofilm après 12 heures, la région mesurée correspond essentiellement à une petite microcolonie correspondant à quelques bactéries. La largeur à mi-hauteur du profil d'intensité mesure environ 2 μm , ce qui est de l'ordre de grandeur des bactéries étudiées [98]. Après 70 heures de croissance, le biofilm devient plus épais et couvre la majorité de la région observée. La largeur à mi-hauteur du profil d'intensité est d'environ 9 μm . Le maximum du profil d'intensité est aussi à une position en Z plus élevé qu'au début de la croissance du biofilm. Cela indique que lorsque le biofilm devient épais, la zone où on trouve le maximum de bactéries s'éloigne du fond du microcanal.

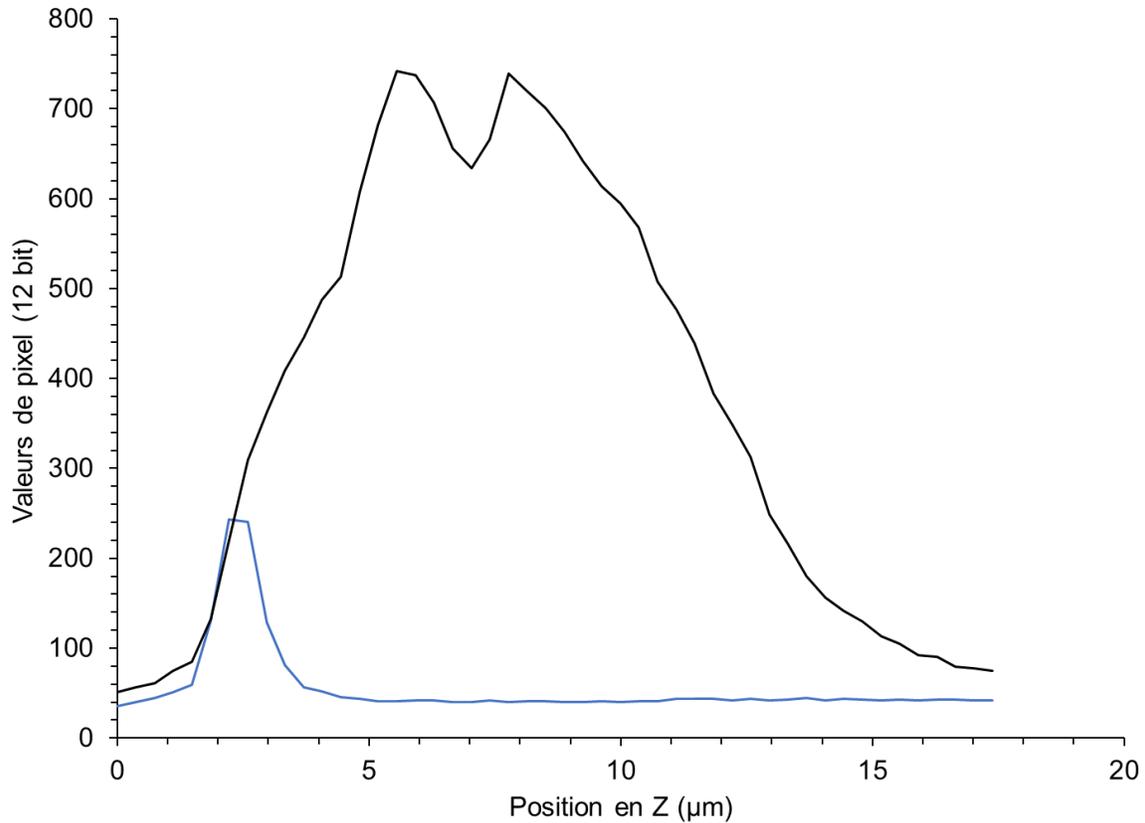


Figure 4-7 : Profil d'intensité (échelle 12 bit) dans l'axe Z pour les régions du biofilm montrées à la Figure 4-6. La courbe en bleu correspond à une microcolonie formée de quelques bactéries qui est représentative du système peu de temps après la période de croissance rapide (12 heures ; encadré jaune à la Figure 4-6 A). La courbe en noir correspond à une portion de biofilm et représente le système à la fin de la croissance (70 heures ; encadré jaune à la Figure 4-6 B). La zone entre 0 et 1,5 µm correspond à la lamelle de verre. L'intérieur du microcanal commence à partir de 1,5 µm.

4.4.1 Aire occupée par les bactéries

La Figure 4-8 montre l'aire occupée par le biofilm pour chaque tranche sondée en microscopie confocale pendant la croissance. Cela permet de suivre de manière plus globale la croissance du biofilm. Aux distances Z faibles on observe que les mesures d'aire sont de zéro et qu'il y a une démarcation nette autour de 2,75 µm. Cette ligne correspond à l'interface entre la lamelle de verre et l'intérieur du microcanal. On observe une augmentation marquée de l'aire occupée pour toutes

les tranches du biofilm après environ 7 heures, soit la phase de croissance rapide. Entre le début de la croissance jusqu'à la phase de croissance rapide, la zone où on retrouve le plus de bactéries est localisée directement au fond du microcanal. Par la suite, elle est située à une distance de la lamelle de verre autour de 5,5 μm . Cela indique que lorsque le biofilm devient plus épais, les bactéries se déplacent pour occuper les couches plus élevées. Il est important de noter que l'on pourrait aussi retrouver des bactéries inactives au fond du microcanal. Les résultats obtenus en microscopie confocale confirment ceux obtenus en spectroscopie infrarouge.

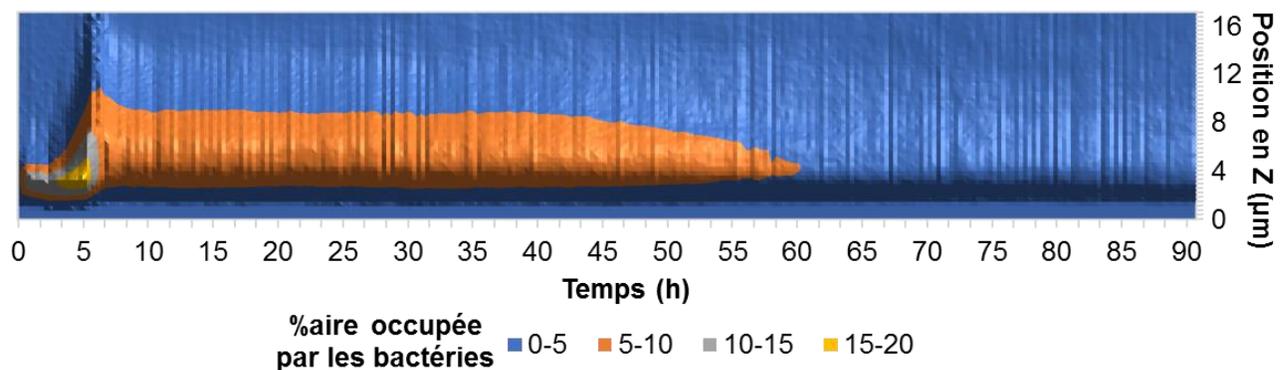


Figure 4-8 : Graphique de contour du pourcentage de l'aire occupée par les bactéries dans chaque plan XY pour chaque position en Z pendant la croissance déterminée à partir du traitement des empilement confocaux obtenue en microscopie confocale.

Afin de mieux suivre la croissance du biofilm et de comparer les résultats avec ceux acquis en spectroscopie infrarouge, nous avons mesuré l'aire occupée par les bactéries dans les deux premiers micromètres au-dessus de la surface de la lamelle de verre. Cette zone mesurée correspond à la profondeur de pénétration en IR-ATR avec un cristal de diamant. Les résultats obtenus sont représentés à la Figure 4-9. Après une courte période de latence où l'aire est très faible et ne varie pas, on observe une augmentation très rapide. Par la suite, on observe presque

immédiatement une diminution rapide de l'aire. Cela est suivi par une période où il y a diminution lente de l'aire occupée par les bactéries.

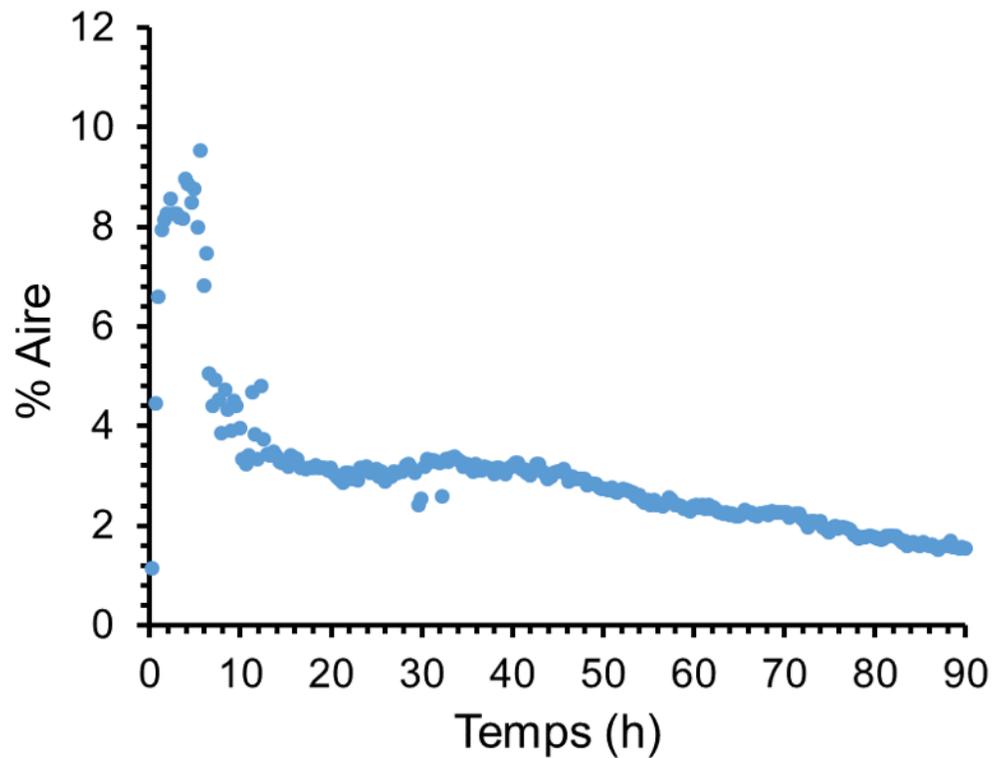


Figure 4-9 : Pourcentage de l'aire occupée par les bactéries entre 0 et 2 μm au-dessus de la surface de la lamelle de verre mesuré à partir de la microscopie confocale. Pour ces mesures, l'aire pour chaque tranche entre 0 et 2 μm dans l'empilement confocal a été mesurée et la moyenne pour chaque point dans le temps a été calculée.

4.5 Discussion

4.5.1 Suivi de la croissance des biofilms par spectroscopie infrarouge et microscopie confocale

Les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge en ATR et par microscopie confocale indiquent que les biofilms ont trois phases distinctes pendant leur croissance. Les mesures en spectroscopie infrarouge et microscopie confocale montrées à la Figure 4-3 et à la Figure 4-9 ont été acquises lors d'expériences réalisées en parallèle dans les mêmes conditions et l'inoculation du biofilm intermédiaire pour l'inoculation par un biofilm en amont a été faite à partir du même inoculum afin de bien pouvoir les comparer. Il y a d'abord une courte phase de latence où les bandes en infrarouge sont faibles et constantes. En microscopie confocale on n'observe que des bactéries isolées. Cette étape est suivie par une phase de croissance rapide où l'absorbance des bandes en spectroscopie infrarouge et le pourcentage de l'aire occupée par les bactéries augmentent rapidement. On observe aussi en microscopie confocale que le biofilm devient plus épais. Les biofilms observés se réorganisent après la phase de croissance rapide. Après cette période, on observe une augmentation plus lente de l'absorbance pour les différentes bandes en spectroscopie infrarouge. La microscopie confocale révèle une diminution de l'aire occupée par les bactéries au fond du microcanal (entre 0 et 2 μm).

Pendant la courte période de latence, les bactéries se familiarisent à leur nouvel environnement, commencent à former des microcolonies et s'attachent irréversiblement à la surface pour former un biofilm. L'absorbance des bandes en spectroscopie infrarouge et l'aire occupée par les bactéries en microscopie confocale augmentent faiblement. Pendant la phase de croissance rapide, l'intensité des bandes des spectres infrarouge et l'aire occupée par les bactéries mesurée par microscopie confocale augmentent. Par la suite, l'intensité des bandes en spectroscopie infrarouge augmente moins rapidement alors que l'aire occupée par

les bactéries diminue. À la fin de la période observée, l'intensité des bandes en spectroscopie infrarouge et l'aire occupée par les bactéries diminuent. Il est attendu que pendant le développement du biofilm, l'intensité des bandes infrarouge ainsi que l'aire occupée par les bactéries augmentent. La diminution d'aire occupée indique, donc qu'il y a une réorganisation dans la distribution des bactéries au sein du biofilm.

Cette réorganisation du biofilm peut être reliée à la formation d'un gradient d'oxygène et de nutriments entre la solution de nutriments entre la partie extérieure et la couche la plus profonde du biofilm. Lorsque le biofilm se développe, la partie interne devient de plus en plus éloignée de la surface et la matrice extracellulaire devient plus dense. La majeure partie des nutriments et de l'oxygène est consommée par les bactéries situées à l'interface avec le milieu de culture et on s'attend à ce que la concentration diminue graduellement dans les parties plus profondes. En réaction à ce changement d'environnement, les bactéries peuvent diminuer leur métabolisme jusqu'à devenir éventuellement dormantes ou se déplacer dans le biofilm. Afin de diminuer les effets de gradient de concentration, les biofilms peuvent aussi former des structures tridimensionnelles.

4.5.2 Effet de la méthode d'inoculation

La méthode d'inoculation du biofilm peut avoir un effet sur sa formation et sa croissance. Les inoculations directe et indirecte seront comparées par les méthodes présentées précédemment. La première méthode consiste à injecter les cellules dans le canal à l'aide d'une aiguille afin d'introduire les cellules dans le microcanal. La seconde consiste à d'abord faire croître un biofilm dans un tube en amont du microcanal puis à s'en servir pour inoculer le dispositif tel que décrit à la section expérimentale.

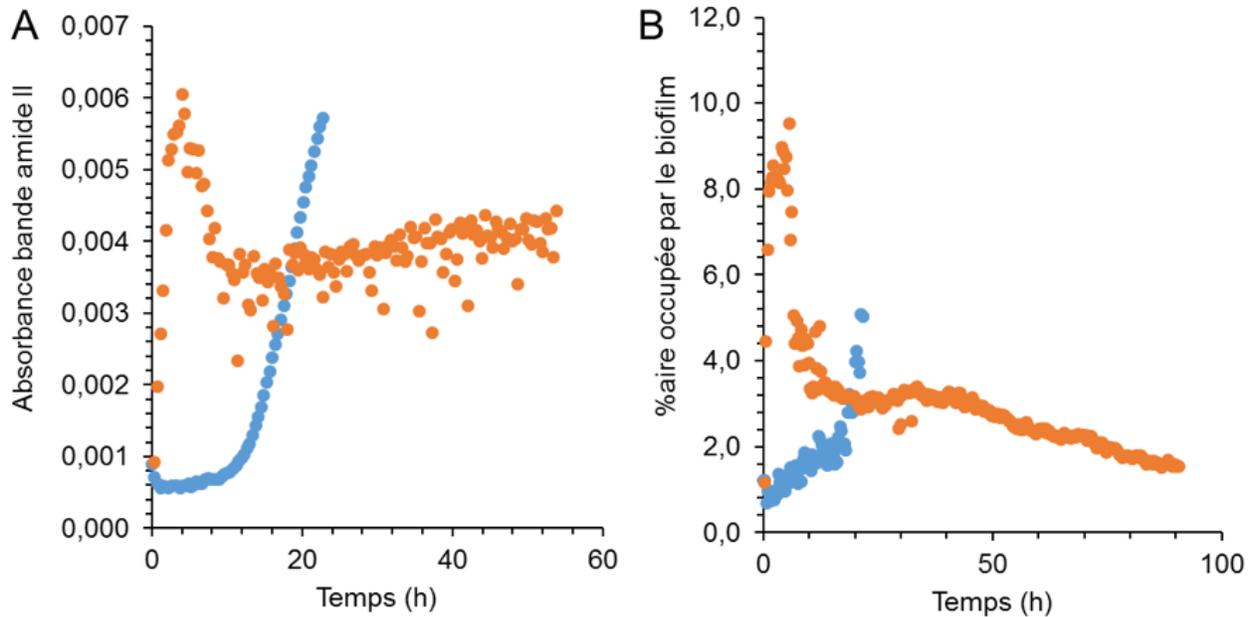


Figure 4-10 : Courbe de croissance obtenue par A) spectroscopie infrarouge et B) microscopie confocale pour des biofilms en inoculation directe (bleu) et indirecte (orange).

La Figure 4-10 montre les courbes de croissance typiquement obtenues par spectroscopie infrarouge et microscopie confocale pour des biofilms préparés par inoculation directe et indirecte. Il est important de noter que les expériences ont été reproduites à plusieurs reprises pour les deux types d'inoculation et que les résultats montrés ici sont représentatifs de ce qui a été observé en général. Une des différences importantes entre l'inoculation directe et en amont est la durée de la période de latence. La Figure 4-11 montre la durée de la période de latence moyenne pour plusieurs expériences pour l'inoculation directe et l'inoculation en amont tel qu'observé par spectroscopie infrarouge et microscopie confocale. Pour les données en spectroscopie infrarouge, la mesure a été faite à partir de l'absorbance de la bande amide II. La période de latence mesurée avec les autres bandes est la même. Pour les mesures en microscopie confocale, la mesure a été faite à partir des mesures d'aire recouverte par le biofilm sur les deux premiers microns au-dessus de la lamelle de verre au fond du microcanal. La période de latence est typiquement plus longue pour les biofilms préparés par inoculation

directe (injection de l'inoculum dans le microcanal). La durée de la période de latence observée est aussi plus courte par microscopie confocale que par spectroscopie infrarouge. L'effet est plus prononcé pour les mesures en inoculation directe. Cela pourrait provenir des différences inhérentes entre les deux techniques. Les mesures prises en microscopie confocale sont basées sur la fluorescence de la protéine GFP qui est exprimée par les bactéries utilisées pour ces travaux. Les mesures en spectroscopie infrarouge quant à elles sont faites à partir de l'intensité des bandes d'absorption des différentes biomolécules. Dans ce cas, la bande amide II des protéines a été utilisée. Les empilements confocaux acquis en microscopie confocale indiquent que pendant la période de croissance rapide, les bactéries forment des microcolonies et commencent rapidement à couvrir une proportion plus importante du champ de vision au fond du microcanal. En spectroscopie infrarouge, la quantité de protéines observée au fond du microcanal prend plus de temps avant d'augmenter rapidement que les bactéries. Cela pourrait être relié au seuil de détection plus faible en spectroscopie infrarouge par rapport à la microscopie confocale.

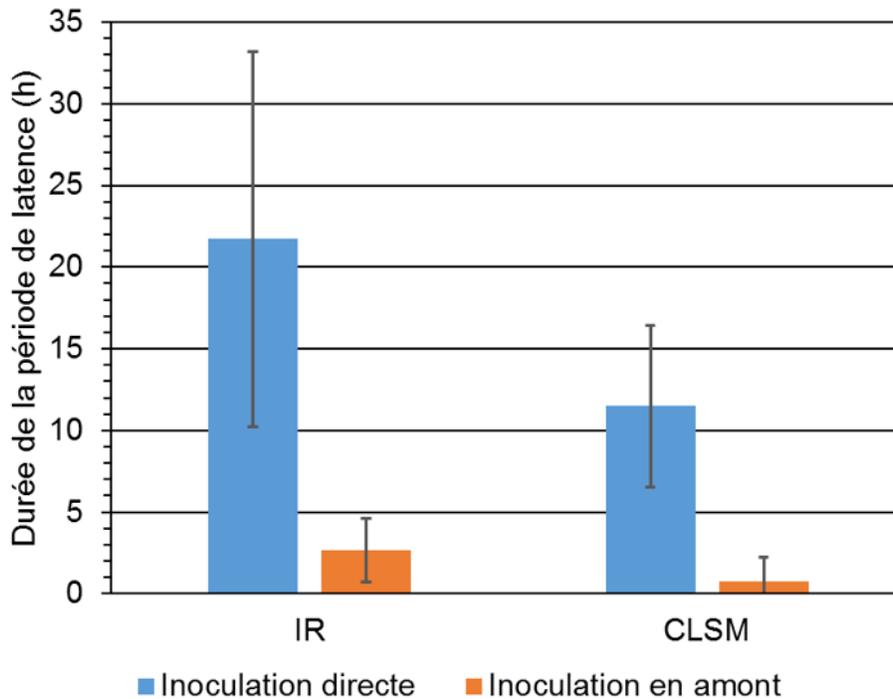


Figure 4-11 : Durée de la période de latence déterminée pour les mesures en spectroscopie infrarouge (IR) et microscopie confocale (CLSM) pour des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 inoculés par injection directe dans le canal et par un biofilm en amont (en bleu et orange, respectivement). Les mesures de période de latence en spectroscopie IR-ATR sont faites à partir de l'absorbance de la bande amide II des protéines (1545 cm^{-1}) pendant la croissance. Pour les mesures en CLSM, la période de latence a été déterminée à partir du pourcentage de l'aire recouverte par les bactéries pendant la croissance. Un milieu de type AB modifié est utilisé. Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins trois expériences et les barres d'erreur sont générées à partir de l'écart type.

4.6 Conclusion

La croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 a été étudiée dans un environnement microfluidique par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (IR-ATR) et en microscopie confocale pendant la croissance. Les profils des paramètres typiquement observés pour les mesures en infrarouge et en microscopie confocale sont plutôt comparables. Après la phase de croissance rapide, on observe une diminution rapide de l'absorbance en infrarouge et de l'aire

recouverte par les bactéries en microscopie confocale. Par la suite, l'absorbance dans l'infrarouge reste plutôt constante pour toutes les bandes analysées (Figure 4-1). Pendant ce temps, en microscopie confocale, l'aire recouverte par les bactéries sur la surface de la lamelle de verre continue à diminuer. La diminution de la quantité de bactéries indique une restructuration du biofilm pendant la maturation du biofilm.

En spectroscopie infrarouge, le ratio entre les bandes amide II (1545 cm^{-1}) et $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ (1085 cm^{-1}) permet de suivre la proportion relative entre les protéines et les acides nucléiques dans le biofilm. Lors la phase de croissance rapide, ce ratio diminue alors qu'il augmente par la suite. Cela reflète l'augmentation plus rapide de la concentration en acides nucléiques par rapport aux protéines pendant la croissance rapide où il y a beaucoup de division cellulaire et d'activité métabolique. Par la suite, le biofilm se restructure et les bactéries changent de métabolisme, ce qui explique l'augmentation de la proportion de protéines. En microscopie confocale, on observe que les bactéries formant le biofilm se trouvent directement au fond du microcanal jusqu'à la fin de la phase de croissance rapide. Par la suite, il y a déplacement vers les couches supérieures du biofilm pour la majorité des bactéries, ce qui se reflète par un signal plus élevé pour les bactéries autour de $5\text{ }\mu\text{m}$ au-dessus du fond du microcanal à partir de ce moment.

Finalement, ces deux techniques ont permis d'évaluer deux méthodes d'inoculation pour les biofilms. La première, l'inoculation directe, consiste à injecter directement une solution de bactéries planctoniques dans le microcanal. La seconde, l'inoculation par un biofilm en amont, consiste d'abord à faire croître un biofilm dans un tube intermédiaire, puis à utiliser son effluent afin d'inoculer le microcanal étudié. Cette méthode est représentative de plusieurs systèmes naturels où les bactéries libérées par un biofilm colonisent une nouvelle surface. Nous avons démontré que l'inoculation par un biofilm en amont est préférable à l'inoculation directe. En effet, la période de latence pour la croissance est plus courte et les résultats obtenus sont plus reproductibles, ce qui peut être observé par un écart type plus faible sur les mesures. En comparaison avec les bactéries planctoniques, les bactéries éjectées

par un biofilm ont un métabolisme déjà adapté pour la formation d'un nouveau biofilm. Cela permet d'avoir une période de latence beaucoup plus courte et plus reproductible. Ce plus grand contrôle sur le développement du biofilm par l'inoculation par un biofilm en amont combiné aux mesures par spectroscopie infrarouge en ATR et par microscopie confocale pourra être utilisés pour de futures études des biofilms en milieu microfluidique. Cela ouvre la voie pour l'évaluation de méthodes pour contrôler les biofilms de bactéries *Pseudomonas*. Plus particulièrement, des surfaces anti-biofilm et des molécules antibiotiques pourront être évalués par ces techniques. Les méthodes et technologies issues de ces travaux pourraient aussi être appliqués aux biofilms d'autres bactéries et aux biofilms mixtes.