

Chapitre 2 : Techniques utilisées

Une grande variété de techniques peut être utilisée pour la caractérisation des biofilms. La majorité des études est faite à partir de la microscopie optique et microscopie à fluorescence. La grande complexité des biofilms rend nécessaire l'utilisation de techniques permettant de suivre directement les différents composés biochimiques les composant. La possibilité de combiner les méthodes optiques à celles fournissant l'information chimique permettrait d'avoir des indices plus complets sur la formation des biofilms. Les différentes techniques de microscopie sont principalement utilisées pour suivre la croissance et la morphologie des biofilms. Les techniques de spectroscopie quant à elles servent plutôt à suivre la composition des biofilms pendant leur croissance. Différentes méthodes d'électrochimie peuvent aussi être utilisées pour l'étude des biofilms formés par des bactéries pouvant produire un courant électrique lors de leur métabolisme [52, 53]. Dans la majorité des cas où des techniques spectroscopiques ou électrochimiques sont utilisées, la microscopie permet de confirmer les informations obtenues. Il est aussi important d'avoir un grand contrôle sur l'environnement physique pour faire ces mesures. Pour ce faire, la microfluidique est utilisée.

2.1 Microfluidique

La microfluidique est un domaine scientifique et technique se concentrant sur les systèmes où sont manipulés des fluides dans des canaux dont une des dimensions caractéristiques est de l'ordre de la dizaine à quelques centaines de micromètres. Dans ces ordres de grandeur, on obtient un écoulement laminaire puisque la viscosité devient plus importante que l'inertie. Dans un système laminaire, les liquides s'écoulent en couches parallèles sans discontinuité entre elles. Par conséquent, deux liquides miscibles ne peuvent se mélanger que par diffusion. Ce

phénomène permet de former des systèmes où deux solutions aqueuses de forces ioniques similaires se déplacent sans se mélanger par convection. Le nombre de Reynolds (Re ; sans unités) est couramment utilisé pour définir l'écoulement dans un système fluide. On détermine typiquement le nombre de Reynolds à partir de la viscosité dynamique du liquide (μ ; Ns/m^2), sa masse volumique (ρ), le diamètre hydraulique du canal L (m), le débit du liquide Q (m^3/s) et l'aire de la section transversale du microcanal A (m^2) tel que décrit par l'équation 3-1. Pour un canal rectangulaire fermé, le diamètre hydraulique L peut être calculé à partir de la hauteur et la largeur (h et l , respectivement) selon l'équation 3-2.

$$Re = \frac{\rho \cdot Q \cdot L}{\mu \cdot A} \quad \text{Équation 2-1}$$

$$L = \frac{2 \cdot h \cdot l}{h + l} \quad \text{Équation 2-2}$$

Lorsque le nombre de Reynolds est en dessous de 2000, on est en situation de flux laminaire. Dans les systèmes microfluidiques, puisque l'aire de la section transversale est faible le nombre de Reynolds est inférieur à un. Le nombre de Péclet (Pe ; sans unité) sert à représenter le rapport entre le transfert par convection et celui par diffusion. Ainsi un nombre de Péclet faible indique que le transfert massique se fait principalement par diffusion. Il est calculé à partir du diamètre hydraulique L , du débit Q et de l'aire de la section transversale du microcanal A et du coefficient de diffusion du liquide D_{aq} (m^2/s) selon l'équation 3-3.

$$Pe = \frac{L \cdot Q}{A \cdot D_{aq}} \quad \text{Équation 2-3}$$

Un autre paramètre important dans les systèmes microfluidiques, spécialement pour la croissance des biofilms, est la force de cisaillement. Dans un système avec un écoulement laminaire, la vitesse du liquide est maximale au centre du microcanal et est nulle juste à côté des murs. On a donc un gradient de vitesse, ce qui induit un cisaillement entre les différentes couches du liquide. La vitesse moyenne v_m (m^2/s) dans un microcanal est calculée à partir de l'équation 3-4 et la force de

cisaillement moyenne τ_m (N/m²) se calcule à partir l'équation 3-5. La vitesse de déformation (γ_m ; s⁻¹) est utilisée pour calculer la force de cisaillement moyenne τ_m et est déterminée à partir de l'équation 3-5

$$v_m = \frac{Q}{h \cdot l} \quad \text{Équation 2-4}$$

$$\tau_m = \gamma_m \cdot \mu \quad \text{Équation 2-5}$$

$$\gamma_m = \frac{6 \cdot Q}{l \cdot h^2} \quad \text{Équation 2-6}$$

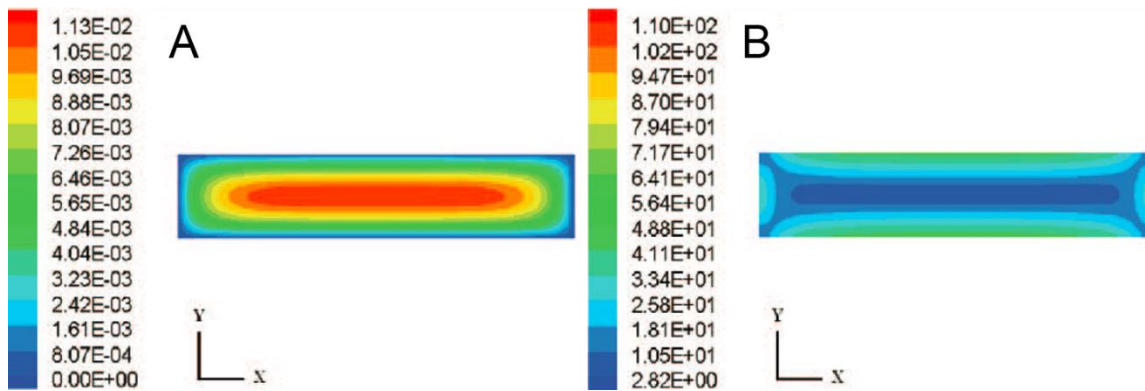


Figure 2-1 : Simulation computationnelle dynamique d'écoulement A) de la vitesse (m/s) et B) de la vitesse de déformation (1/s) dans la section transversale d'un canal microfluidique avec une section transversale rectangulaire. Les forces de cisaillement correspondent à la vitesse de déformation multipliée par la viscosité dynamique du fluide s'écoulant dans le microcanal. Figure tirée de Salek et coll. [54].

La Figure 2-1 montre une simulation computationnelle dynamique d'écoulement de la force de cisaillement dans la section transversale d'un canal microfluidique rectangulaire. On peut voir qu'à proximité des murs, la vitesse du liquide est nulle alors qu'elle est maximale au centre du canal. Les forces de cisaillement se développent entre deux régions de vitesse différentes. Puisque la vitesse est minimale à proximité du mur et qu'il y a un gradient de vitesse, c'est à cet endroit qu'on retrouve des vitesses de déformation maximales et par conséquent des forces de cisaillement maximales [54]. Aux coins du dispositif, on peut observer l'effet

combiné de deux murs. Cela fait qu'il y a moins de circulation du liquide à ces endroits et on peut voir un effet sur les forces de cisaillement locales. Cela peut avoir un effet important sur la croissance des biofilms puisqu'ils sont à la fois influencés par les forces de cisaillement et par la disponibilité des nutriments.

2.1.1 Utilisation de la microfluidique pour l'étude des biofilms

La microfluidique est de plus en plus utilisée dans la littérature pour étudier et contrôler les biofilms [55]. Puisque les biofilms sont des systèmes hautement complexes et hétérogènes dans l'espace et dans le temps, il est utile de bien pouvoir contrôler leur environnement physique et chimique. Cela permet de mieux définir le système étudié et de diminuer le nombre de variables à considérer lors de l'étude. La microfluidique offre l'avantage fondamental de permettre un contrôle précis de l'écoulement [56]. La présence d'un écoulement laminaire en conjonction avec le débit stable offert par les pompes rend le système prédictible. Les petites dimensions du microcanal permettent d'avoir un biofilm couvrant toute la surface plus rapidement et la phase de latence des bactéries est plus courte. De plus, le temps nécessaire pour qu'une bactérie planctonique atteigne une surface est fortement réduit. Finalement, un plus faible volume implique que la quantité de solution de nutriments à fournir est réduite. On peut alors faire une expérience plus longue sans avoir à changer la source de nutriments, ce qui évite une possibilité de contamination. Dans la littérature, le temps requis pour qu'une bactérie se retrouve dans des états d'attachement réversible et irréversible a été déterminé par microscopie à fluorescence à l'aide de dispositifs microfluidiques [57]. Les auteurs ont comparé l'adhésion d'une bactérie sauvage avec celle d'une souche mutante ne produisant pas de pilus. Ces appendices sur la paroi cellulaire ont un impact sur la formation des biofilms [58]. Les deux souches ont été modifiées afin de produire la protéine fluorescente verte (GFP). Cela a permis de confirmer que les pili sont importants pour l'adhésion irréversible. Cependant, les pili ne semblent pas jouer de

rôle important dans l'adhésion réversible puisque ce phénotype est observé de manière comparable pour les deux souches. Il a aussi été observé que le débit dans le dispositif microfluidique modifie le comportement des bactéries. Ainsi, il a été observé que le débit a un impact sur l'expression de différents gènes liés à la détection du quorum, le principal mécanisme de communication entre les bactéries [34].

La possibilité de moduler aisément la force de cisaillement à partir des dimensions du microcanal ou avec le débit permet de voir son effet sur le biofilm. Il a par ailleurs été démontré que la force de cisaillement a un effet sur la quantité de bactéries éjectées d'un biofilm ainsi que sur sa structure [8]. À un nombre de Reynolds faible, les débits élevés favorisent la croissance des biofilms alors qu'à des nombres de Reynolds élevés, les plus hauts débits nuisent à leur développement [59]. Il a aussi été montré que le ratio d'aspect (hauteur par rapport à la largeur) a une influence sur la croissance d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour un dispositif avec une section transversale carrée, le biofilm est plus épais et plus uniforme que pour une section transversale rectangulaire (ratio d'aspect 5 : 1). De plus, pour le dispositif rectangulaire le biofilm au centre du microcanal est mince et forme seulement une couche de bactéries alors qu'il est plus épais dans les coins [54].

La microfluidique est aussi utilisée pour évaluer l'efficacité de différents agents antimicrobiens sur des biofilms. La facilité de fabriquer différentes géométries de microcanaux a permis d'étudier la formation de *streamers* [60]. Ces structures sont constituées d'une partie de biofilm qui est seulement attachée partiellement à la surface. Ils se forment généralement dans des canaux en forme de serpentins, mais il a aussi été démontré qu'ils peuvent se former dans des canaux rectangulaires [61, 62]. Lors de leur détachement de la surface ils contribuent à la prolifération des biofilms.

2.1.2 Méthodes pour la caractérisation dans les systèmes microfluidique

La présence d'un milieu fermé et la petite taille des systèmes microfluidiques imposent une contrainte pour la caractérisation. Toutefois afin d'atteindre le plein potentiel que la microfluidique offre pour l'étude de systèmes chimiques et biochimiques complexes, l'utilisation d'une ou de plusieurs méthodes de caractérisation est cruciale. Cela peut être fait par l'intégration de capteurs dans le microdispositif ou en utilisant des instruments externes. Les mesures de pH, de température et de potentiel sont faites généralement en intégrant un capteur directement dans le dispositif microfluidique [63]. Dans le cas des mesures en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (IR-ATR), le cristal ATR est intégré directement dans l'une des parois du microcanal [64]. Les mesures en microscopie en champ clair sont communément faites pour suivre des réactions chimiques et biochimiques ainsi que pour étudier des systèmes biologiques. La microscopie à fluorescence est aussi utilisée puisqu'elle a l'avantage d'être plus sensible et spécifique à une molécule ciblée que la microscopie en champ clair [65]. En effet, en ajustant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission analysées de manière appropriée pour la molécule cible, il est possible d'observer uniquement cette dernière et de minimiser le bruit de fond relié à la matrice.

Pour l'utilisation des techniques en absorbance, la présence d'eau dans le milieu de culture ainsi que les matériaux utilisés pour la fabrication des dispositifs peuvent aussi représenter une difficulté. Cette contrainte peut être problématique pour les mesures en spectroscopie infrarouge. La microscopie optique s'adapte bien aux systèmes microfluidiques à condition que les matériaux utilisés pour la fabrication soient transparents dans le domaine du visible. Pour la microscopie à fluorescence, il faut aussi s'assurer que le matériau n'émette pas de fluorescence.

2.2 Microscopie

La microscopie optique est la méthode la plus fréquemment utilisée pour l'étude des biofilms. Cette technique se base sur l'absorption et la diffusion de la lumière par un échantillon dans le domaine visible. Elle permet de suivre en temps réel ou en intervalles de temps la croissance des biofilms. Différentes lentilles sont utilisées dans le parcours optique pour focaliser la lumière et magnifier de petits objets. Ceci permet de bien les résoudre sur l'image obtenue. La lumière émise par la lampe (généralement une lampe halogène) est collectée par un condenseur optique et elle est focalisée sur l'échantillon. La lumière est ensuite récoltée par un objectif qui permet de magnifier l'image. Elle est finalement redirigée vers les oculaires afin de voir l'image magnifiée ou vers une caméra afin d'enregistrer l'image. La résolution de l'image dépend de l'ouverture numérique du condenseur et de l'objectif utilisé. Afin d'atteindre une résolution optimale, le microscope doit bien être aligné. Pour les microscopes avec une illumination de Köhler, on obtient une image de la source et une image de l'échantillon. Ces deux images ont différents plans conjugués dans le parcours optique. L'image de la source forme un plan sur le diaphragme d'ouverture du condenseur. En défocalisant l'image de la source sur le plan de l'échantillon, chaque point de la source illumine l'objet entier, ce qui assure un éclairage uniforme.

Il est possible d'étudier les bactéries individuelles ou le biofilm de manière plus globale en utilisant des objectifs de différentes magnifications [66]. La microscopie permet d'observer la croissance globale du biofilm et la formation de microstructures. La microscopie en champ clair en transmission peut aussi servir pour des mesures quantitatives basées sur la densité optique puisqu'elle est proportionnelle à la biomasse [67]. Un autre avantage majeur est qu'il est souvent possible de la combiner avec une autre technique pour la caractérisation. Afin d'obtenir une image, il faut d'abord que l'échantillon permette un contraste suffisant. Il faut donc qu'il absorbe la lumière ou qu'il la diffuse. Afin de bien le discerner du milieu environnant et du dispositif microfluidique, il faut que le milieu de culture ainsi que les matériaux du dispositif microfluidique soient transparents et propres. Le

polydiméthylsiloxane (PDMS) et le verre qui sont utilisés pour la fabrication des dispositifs sont transparents. Il est nécessaire d'éviter la présence de poussière dans le PDMS lors de la préparation et de bien nettoyer les surfaces du dispositif afin d'optimiser la netteté des images.

2.2.1 Mesures de densité optique

La densité optique (O.D.), mesure couramment faite en spectroscopie d'absorption dans le visible, est reliée directement à la biomasse d'un biofilm [67, 68]. Pour un biofilm ne comportant pas de pigment produit par les bactéries, il y a en fait peu d'absorbance dans la région visible. Pour des mesures en transmission, le principal obstacle à la lumière est la diffusion. La densité optique se calcule à partir de l'équation 3-7.

$$O.D. = -\log I/I_0 \quad \text{Équation 2-7}$$

où I_0 est la valeur de pixel sur l'image de référence et I est la valeur de pixel sur l'image à analyser. Les images obtenues en microscopie en champ clair donnent une mesure de l'intensité de la lumière se rendant au détecteur (la caméra CCD dans le cas présent) après avoir passé par l'échantillon. Dans le cas présent, la valeur de chaque pixel dans l'image est associée à l'intensité. L'image de référence est acquise avec le dispositif microfluidique dans des conditions d'acquisition et d'illumination identiques à celles utilisées pour les images pendant les expériences en plus d'être exactement à la même position. En plus de permettre d'avoir les mesures de densité optique, la soustraction de l'image de référence a l'avantage de retirer les effets reliés à l'inhomogénéité de la source d'illumination et des saletés résiduelles et imperfections dans le dispositif microfluidique. En effet, bien que l'alignement du microscope soit effectué avant chaque expérience, il y a généralement un gradient d'intensité du centre vers les bords de l'image avant traitement. De même, malgré le nettoyage du dispositif et les précautions prises

pendant la fabrication, des poussières peuvent se retrouver sur le PDMS ou venir se déposer à sa surface. Si on ne corrige pas l'image pour leur présence, ces points plus foncés pourraient être associés à une présence de biofilm. Cette procédure permet donc de faire des mesures de densité optique pour différentes positions à l'intérieur du microcanal.

2.2.2 Utilisation de la microscopie pour l'étude des biofilms en microfluidique

Les dimensions et les méthodes de fabrication des dispositifs microfluidiques les rendent généralement simples à utiliser pour les expériences en microscopie. Cela présente des avantages considérables puisqu'il n'est pas nécessaire de faire de modifications particulières au dispositif et que la technique s'applique autant aux canaux simples que complexes.

La microfluidique et même certaines cellules d'écoulement où les conditions peuvent être précisément contrôlées sont utilisées dans la littérature. L'imagerie en vidéo accélérée couplée à des modèles numériques permettent de déterminer la viscosité d'un biofilm. Les biofilms se développant dans des microcanaux droits ont été étudiés de cette manière. Il a été observé qu'ils forment des *streamers* par détachement partiel soudain [62, 69]. Un modèle mathématique a aussi été développé afin de déterminer la viscosité du biofilm à partir de la vitesse du biofilm et sa hauteur, la viscosité et la vitesse du milieu de culture et les dimensions du microcanal [26]. Pour ce faire, il est nécessaire de connaître la vitesse nette et l'épaisseur du biofilm en tout temps. Si la densité du biofilm ne varie pas dans le temps, la densité optique est directement proportionnelle à l'épaisseur [26]. La vitesse est mesurée en suivant la position d'un *streamer* dans le temps. Ces mesures sont faites sur plusieurs parties du biofilm et la moyenne est calculée pour plusieurs points dans le temps.

2.3 Microscopie à fluorescence

Lorsque l'échantillon étudié par microscopie est peu absorbant et qu'il diffuse peu la lumière, il est nécessaire de recourir à des stratégies pour rehausser le contraste. Il est entre autres possible de faire de la microscopie en contraste de phase, en biréfringence, en champ sombre ou en fluorescence. Dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse la microscopie à fluorescence a été utilisée. Cette technique permet d'obtenir un contraste élevé spécifique à une cible déterminée. Elle s'applique bien pour le suivi dans le temps des biofilms.

La microscopie à fluorescence repose sur l'absorption d'un photon suivie par l'émission d'un autre photon de plus basse énergie. L'absorption du photon provoque la transition d'un électron du niveau fondamental de la molécule à son premier niveau d'excitation. Après relaxation non radiative dans l'état excité, un photon est émis. En fluorescence, la lumière est émise dans toutes les directions. L'intensité de la lumière réémise dépend de différents facteurs incluant l'efficacité du fluorophore à absorber et réémettre la lumière, sa concentration et le milieu environnant. Pour la majorité des instruments conventionnels, les mesures sont faites en épifluorescence. Dans ce cas, la lumière réémise par le fluorophore est détectée du même côté de l'échantillon que la source. La lumière partant de la source passe d'abord par un filtre laissant passer une plage de longueurs d'onde correspondant à la bande d'excitation du fluorophore. Elle est alors focalisée sur l'échantillon par l'objectif. La lumière réémise est récoltée par l'objectif et passe par un filtre laissant passer seulement les longueurs d'onde correspondant à la bande d'émission du fluorophore. Elle est alors réfléchiée par un miroir dichroïque. Cette composante est conçue pour réfléchir la lumière correspondant à l'excitation du fluorophore et laisser passer les autres longueurs d'onde. Cela est important puisque la lumière provenant de la source doit aussi passer par le miroir dichroïque. Finalement, une caméra CCD permet de capter les photons. Cela permet d'avoir une image de l'échantillon où l'on voit seulement les parties contenant le fluorophore.

2.3.1 Marqueurs fluorescents pour les biofilms

Un des avantages de la fluorescence pour l'étude des biofilms est que la plupart ne sont pas fluorescents naturellement. Cela fait que la fluorescence qui sera observée proviendra uniquement des marqueurs fluorescents ajoutés à l'échantillon. En choisissant de manière appropriée les chromophores pour des biomolécules ou métabolites spécifiques, il est possible de les visualiser. Pour le suivi *in situ* des biofilms vivants, la protéine fluorescente verte (GFP) ainsi que d'autres protéines de cette famille sont utiles [70]. Elles sont produites directement par les cellules bactériennes qui ont été modifiées par génie génétique. D'autres composés sont aussi utilisés selon la littérature pour pouvoir observer le biofilm et plus particulièrement la matrice extracellulaire [71].

2.3.2 Protéine fluorescente verte (GFP)

La protéine fluorescente verte a été isolée par Shimomura et coll. à partir de la méduse *Aequorea victoria* [72]. Cette protéine possède 238 acides aminés. Elle absorbe dans l'ultraviolet et le bleu avec une bande d'excitation à 395 nm et une autre à 475 nm. Elle émet une lumière verte avec une longueur d'onde centrée à 509 nm. L'avantage de l'utilisation d'une protéine fluorescente est qu'il est possible de la faire exprimer par différents organismes. Par génie génétique, il est possible d'insérer un plasmide codant pour la protéine GFP dans une cellule. Lors du métabolisme normal de la cellule, la GFP est exprimée, ce qui permet de l'observer par microscopie à fluorescence. Il est aussi possible de relier le gène codant pour la GFP à un autre gène. Par conséquent, lorsque la cellule exprime ce gène, la GFP est produite et il est possible de visualiser l'endroit dans la cellule où ce gène est exprimé et sous quelles conditions [73, 74]. Différentes variantes de la GFP ayant différentes longueurs d'onde d'absorption et d'émission existent et permettent d'utiliser plusieurs protéines fluorescentes en même temps ou de réaliser des expériences complexes.

Alors que la majorité des fluorophores organiques utilisés en tant que marqueurs ont une certaine toxicité pour les cellules, limitant ainsi les études prolongées d'un même échantillon, la GFP ne pose pas de problème pour la croissance de la cellule. Une autre caractéristique intéressante est que le gène est hérité par les différentes générations, ce qui permet de suivre les bactéries pendant la croissance du biofilm. Autrement, il faut procéder au marquage à différents moments pendant l'expérience, ce qui invariablement altérerait le métabolisme des bactéries du biofilm.

Le marquage des biofilms à partir de différentes molécules organiques est couramment utilisé dans la littérature. Cette stratégie comporte plusieurs avantages. Elle permet d'observer un ou plusieurs de phénomènes reliés au métabolisme qui sont typiques d'un phénotype. La possibilité d'identifier certains phénotypes (par exemple le marquage des cellules vivantes et mortes) repose principalement sur le métabolisme des cellules.

2.3.3 Autres molécules pour le marquage des biofilms

Les protéines pouvant être produites par les bactéries, comme la GFP, permettent de les observer spécifiquement, par contre elles ne permettent pas d'observer la partie principale du biofilm qui est la matrice extracellulaire. Cette dernière comporte généralement une proportion importante de polysaccharides. Par conséquent, ils sont une cible intéressante pour le marquage spécifique de la matrice extracellulaire. Les lectines sont une famille de protéines qui a la particularité de se lier aux polysaccharides. Plus particulièrement, chaque lectine a la particularité de cibler une séquence spécifique de monosaccharides. Ainsi, en choisissant la bonne lectine, il est possible de marquer seulement les polysaccharides de la matrice extracellulaire puisqu'ils ont une séquence différente de ceux se trouvant en surface et à l'intérieur des bactéries. Cette stratégie a d'ailleurs été récemment utilisée pour inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide d'une molécule mimant les carbohydrates [75]. Afin de pouvoir faire des observations en microscopie à

fluorescence, une molécule fluorescente peut être greffée aux lectines. La molécule fluorescente peut être choisie spécifiquement afin d'absorber et d'émettre à des longueurs d'onde spécifiques. Cela peut être intéressant dans le cas où il est nécessaire d'observer différents fluorophores simultanément. Cette approche pour marquer les biofilms peut être utilisée de manière relativement douce puisqu'elle change pas directement le métabolisme des bactéries. Toutefois, cela implique d'ajouter une molécule externe au biofilm et pose un risque d'avoir un effet sur la croissance du biofilm par la suite.

2.4 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie confocale à balayage laser permet d'obtenir une excellente résolution dans les axes XYZ. Couplée à la microfluidique, elle permet d'étudier *in situ* la croissance des biofilms marqués avec un fluorophore. La microscopie confocale est essentiellement une version plus complexe de la microscopie à fluorescence où l'on peut résoudre différents plans focaux. Cela est rendu possible par l'utilisation d'un sténopé (*pinhole*).

En microscopie confocale, la source d'excitation est un laser. Cette approche permet d'avoir une source dont l'intensité est ajustable. Comme un laser est une source collimatée, il est possible de focaliser le faisceau sur un point précis et d'exciter seulement cette zone. Il est important de noter que l'utilisation d'un laser comme source d'excitation implique qu'il est nécessaire d'utiliser différents lasers pour exciter des fluorophores avec diverses bandes d'excitation. Afin d'échantillonner dans le plan XY, l'appareil déplace le faisceau laser. Pour échantillonner différents plans, la distance entre l'objectif et l'échantillon est ajustée automatiquement par l'instrument. La lumière réémise par l'échantillon est ensuite récoltée par l'objectif et passe au travers d'un miroir dichroïque. Un sténopé permet ensuite de sélectionner seulement les photons provenant du point focal de l'objectif. Cette composante doit être placée à un des plans focaux conjugués à celui de l'objectif. La plage de

longueurs d'onde à analyser est ensuite sélectionnée avant que la détection se fasse à l'aide du détecteur. Pour la plupart des instruments, un tube photomultiplicateur (PMT) est utilisé pour la détection. Ce type de détecteur est très sensible, ce qui est important puisque l'acquisition est faite point-par-point afin de construire l'image. Cela permet de raccourcir le temps pour obtenir une image complète et de minimiser l'intensité du laser, évitant ainsi les photodommages de l'échantillon. La sélection des longueurs d'ondes peut être faite à partir de filtres comme en microscopie à fluorescence. Toutefois, plusieurs instruments utilisent un réseau avec une fente. La microscopie confocale permet aussi d'obtenir simultanément des images avec différents fluorophores. Dans ce cas, il est nécessaire d'avoir autant de détecteurs que le nombre de fluorophores analysés. Pour chaque longueur d'onde, un laser différent est utilisé. L'appareil combine le parcours optique des lasers et les balait simultanément sur l'échantillon. Pour la détection, un miroir dichroïque réfléchissant les longueurs d'onde à analyser est placé devant le détecteur. Les autres longueurs d'onde passent au travers et peuvent être détectées de la même manière pour les autres fluorophores.

Il est important de considérer quelques limitations liées à la microscopie confocale. Tout comme pour les autres méthodes de microscopie, l'objectif utilisé pour l'expérience sera déterminant pour la résolution maximale atteignable. Cependant, les objectifs à grande magnification ont un champ de vision plus restreint, ce qui limite la zone pouvant être échantillonnée. Ils ont aussi une distance de travail plus courte, ce qui limite la profondeur pouvant être étudiée. Pendant la croissance, la hauteur du biofilm augmente. Si le biofilm devient plus haut que la distance de travail de l'objectif, une partie du biofilm ne peut plus être échantillonné. On peut alors utiliser un autre objectif ou concevoir l'expérience de manière à avoir une concordance entre la hauteur du microcanal et la distance de travail de l'objectif. Ajuster la largeur du microcanal avec le champ de vision de l'objectif peut être aussi intéressant.

Les bactéries et le biofilm peuvent absorber et diffuser la lumière. Cela peut poser des problèmes si on veut obtenir des informations quantitatives. Il est important de rappeler qu'en microscopie confocale, la première couche analysée est celle directement en contact avec la lamelle de verre au fond du microcanal, donc la base du biofilm. Lorsque le biofilm s'épaissit, sa surface s'éloigne de la base et les photons émis par fluorescence peuvent être réabsorbés ou diffusés par les couches inférieures avant d'être récoltés par l'instrument.

2.4.1 Utilisation de la microscopie confocale pour l'étude des biofilms

La microscopie confocale a permis de mieux comprendre la croissance des biofilms [76, 77]. Elle a notamment permis d'étudier la formation des structures en filament (*streamers*). Les groupes de H. Stone et A. Kumar ont étudié la formation des *streamers* dans les canaux en forme de S [10, 61, 78] et dans des dispositifs avec des micropiliers [60]. Par simulation des propriétés hydrodynamiques dans ce type de canal, on observe qu'il y a formation d'une paire de vortex tournants en sens inverses l'un de l'autre. Ces vortex favorisent l'accumulation de matière et de bactéries au centre du canal, permettant la formation des *streamers*. La microscopie confocale a indiqué que ces structures sont attachées au microcanal seulement à partir des murs de côté et ne touchent pas aux murs du haut et du fond. Il a aussi été démontré que les *streamers* ont la capacité de capturer des bactéries circulant dans le canal. De cette manière, le développement des *streamers* et du biofilm est accéléré. Ces phénomènes sont reliés au bioencrassement des filtres et à l'obturation des tuyaux [60].

En utilisant des molécules fluorescentes possédant différents coefficients de diffusion et spectres d'émission et d'absorption, des auteurs ont étudié la diffusion dans un biofilm. Des dextranses de poids moléculaires variés, des microsphères de polymère et des nanoparticules d'argent attachées à des fluorophores sont aussi utilisés pour étudier la diffusion de nanoparticules dans un biofilm. La microscopie

confocale est importante pour ce type d'études puisqu'elle permet de faire des mesures à l'intérieur du biofilm dans les trois dimensions, et ce, rapidement pour différents fluorophores. Cela a permis de montrer que les conditions de croissance du biofilm ont un impact sur la densité de la matrice extracellulaire et des bactéries, ce qui affecte la diffusion des nanoparticules [79].

2.5 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge permet d'obtenir de l'information sur la composition en biomolécules des biofilms. Cette technique se base sur l'absorption de la lumière dans le domaine infrarouge. En spectroscopie infrarouge, la transition observée est reliée aux vibrations des molécules. Trois facteurs influencent l'absorbance (a) en infrarouge : le coefficient d'absorptivité (ϵ ; $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), la concentration (c ; mol/L) et la longueur du parcours optique (b ; cm) tel que décrit par la loi de Beer-Lambert (Équation 3-8).

$$a = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Équation 2-8}$$

Le coefficient d'absorptivité est directement relié à la molécule et la transition vibrationnelle étudiée. Grâce à la relation linéaire entre l'absorbance et la concentration, on peut utiliser la spectroscopie infrarouge pour suivre les changements dans la concentration d'une biomolécule à partir du spectre. Pour que cela soit vrai, il faut cependant que l'absorbance soit inférieure à un. Au-delà de cette valeur, l'échantillon est trop absorbant, peu de lumière le traverse et la réponse du détecteur n'est plus linéaire. La longueur du parcours optique a aussi un impact important sur l'absorbance. En fonction de l'échantillon utilisé ainsi que du solvant, il est possible de l'ajuster afin d'éviter qu'il n'y ait saturation. Pour l'eau par exemple, le parcours optique doit être inférieur à environ 10 μm pour avoir une absorbance inférieure à un.

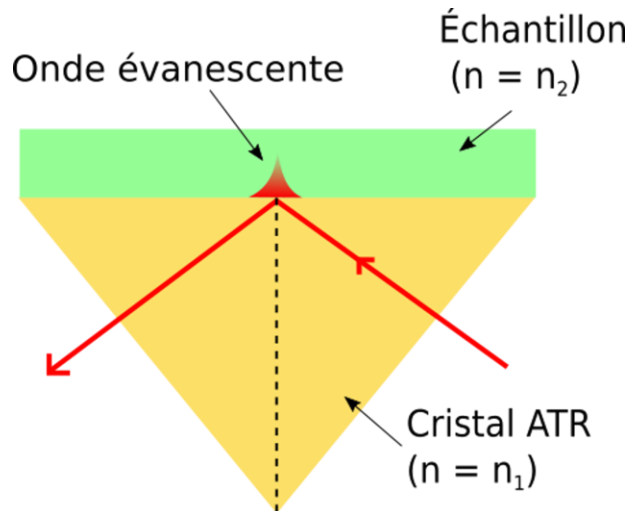


Figure 2-2 : Schéma représentant un cristal infrarouge pour la spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée.

Afin d'étudier les biofilms *in situ*, la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée a été utilisée. La Figure 2-2 représente le cristal avec le faisceau arrivant de la source du côté droit. Le faisceau qui ressort du cristal ATR est détecté du côté gauche. Lorsqu'un faisceau arrive à l'interface avec un milieu d'indice de réfraction n_2 plus faible que celui du milieu initial n_1 , il y a réflexion totale interne si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique θ_c défini à l'équation 3-9.

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad \text{Équation 2-9}$$

Il y a alors formation d'une onde évanescente dont l'intensité décroît exponentiellement à l'interface entre les deux milieux en raison de la continuité des champs électriques. C'est cette onde évanescente qui pourra être absorbée par l'échantillon et qui nous permettra d'obtenir un spectre infrarouge. On définit alors la profondeur de pénétration d_p comme étant la distance parcourue pour que l'amplitude du champ électrique corresponde à e^{-1} de sa valeur à la surface et est définie par :

$$d_p = \frac{\lambda}{2 \cdot \pi \cdot (n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}} \quad \text{Équation 2-10}$$

où λ est la longueur d'onde et θ est l'angle d'incidence du faisceau infrarouge par rapport à la normale de la surface du cristal. Il est important de considérer que la profondeur de pénétration est dépendante de la longueur d'onde. Ce faisant, le parcours optique sera plus long pour les nombres d'onde plus faibles et plus court à haut nombre d'onde. Dans le cadre de ces travaux un cristal de diamant ($n = 2,4$) a été utilisé. Par conséquent, la profondeur de pénétration varie entre un et deux micromètres dans région spectrale étudiée. Cela permettra d'étudier la couche inférieure du biofilm.

2.5.1 Utilisation de la spectroscopie infrarouge pour l'étude des biofilms en microfluidique

Deux stratégies sont utilisées pour intégrer la spectroscopie infrarouge aux systèmes microfluidiques : la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée avec un cristal ATR formant une des surfaces du canal et des cellules en transmission. Dans le cas des cellules en transmission, un intercalaire avec le motif du microcanal est placé entre deux fenêtres transparentes dans le domaine infrarouge. Cela fonctionne généralement bien, toutefois cela est problématique pour l'étude des biofilms. La croissance du biofilm se fait en milieu aqueux. L'eau absorbe fortement dans le domaine infrarouge. On peut en principe diminuer l'espacement entre les fenêtres pour contrer ce problème ($d < 10 \mu\text{m}$), mais dans ce cas, la distance devient comparable aux longueurs d'ondes utilisées et on observe des franges d'interférence. De plus, pour avoir une bonne qualité de spectres en spectroscopie infrarouge il est préférable d'avoir un échantillon homogène. Cela n'est pas possible dans le cas des biofilms. La microscopie infrarouge en transflexion avec une source synchrotron a déjà été utilisée dans la littérature pour régler ces problèmes [80].

La spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée permet d'éviter les problèmes majeurs liés à l'étude d'un échantillon inhomogène en milieu aqueux.

On peut ainsi obtenir des informations utiles sur la composition et l'activité des biofilms. La majorité des études répertoriées dans la littérature ont été faites à partir d'une cellule d'écoulement placée sur un cristal de germanium [32]. Le germanium possède un indice de réfraction de 4. Par conséquent, la profondeur de pénétration avec un cristal de germanium (entre 0,5 et 1 μm) est plus faible qu'avec le diamant (entre 1 et 2 μm). D'autres matériaux ont aussi été utilisés tels que le ZnSe et le AMTIR ($\text{Ge}_{33}\text{As}_{12}\text{Se}_{55}$) [66]. Ces matériaux présentent toutefois une certaine toxicité pour les bactéries et peuvent donc influencer le développement du biofilm.

La spectroscopie IR-ATR a été utilisée précédemment afin de suivre la croissance et l'activité de biofilms. Dans le cadre de ces études, les auteurs ont utilisé une cellule d'écoulement placée sur le cristal de germanium. Des spectres infrarouges ont alors été acquis pendant le développement du biofilm. L'effet de certaines conditions sur un biofilm a aussi été étudié. Entre autres, cela a permis d'observer l'effet d'un changement de concentration en molécules organiques dissoutes dans un échantillon d'eau sur des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* [31]. De cette manière, la spectroscopie infrarouge permet de suivre la vitesse de croissance d'un biofilm. Cette technique pourrait être utilisée comme indicateur de la biostabilité d'une source d'eau potable. Ce facteur est important puisqu'il donne une indication de la possibilité d'une source d'eau à supporter rapidement la formation d'un biofilm.

Le développement des biofilms est généralement suivi à partir de l'absorbance de différentes bandes en infrarouge ou de leur ratio. L'augmentation de l'absorbance pour les différentes composantes du spectre est un bon indicateur de la croissance. Le ratio des différentes bandes peut donner des informations sur le métabolisme des bactéries. Pink et *al.* ont observé un plus faible ratio entre les bandes amide II et la bande entre 1200 et 1350 cm^{-1} correspondant à l'amide III des protéines et à la bande $\nu_{\text{a}}\text{PO}_4^{2-}$ des acides nucléiques lorsque les bactéries sont dans la phase planctonique [66]. Le ratio des bandes des acides nucléiques et des polysaccharides peut aussi nous indiquer si les bactéries sont dans une phase de croissance exponentielle [32]. De plus, un rapport élevé entre les bandes des acides nucléiques

et les bandes des protéines donne une indication sur le métabolisme. Il sera plus élevé lorsque les bactéries sont très actives et ne dépend pas nécessairement de leur état planctonique ou sessile [32, 66].

La combinaison des méthodes de spectroscopie infrarouge et de microscopie en fluorescence peut se révéler utile pour mieux suivre les premières étapes de croissance des biofilms. Dans la littérature, cette combinaison de techniques a été utilisée et a révélé des différences entre les bactéries planctoniques et celles attachées au substrat [32]. Cela a notamment permis d'observer des différences importantes dans le métabolisme pour les biofilms obtenus en inoculation continue avec des bactéries planctoniques et ceux obtenus en faisant circuler un milieu de culture au-dessus de la surface inoculée. La microscopie à fluorescence a permis dans ce cas d'observer comment le biofilm se répand à la surface. Dans ce cas, les auteurs ont étudié les biofilms de *Pseudomonas fluorescens* avec un milieu de culture de type LB dans une cellule d'écoulement construite autour d'un cristal ATR en germanium. Puisque la profondeur de pénétration du cristal de germanium est faible, on observe seulement la couche de base du biofilm. Pour les mesures en microscopie à fluorescence, le cristal de germanium a été retiré du système puis les cellules ont été fixées avant d'être marquées avec des fluorophores. Cette méthode ne permet donc pas d'observer l'état du biofilm en microscopie pendant toutes les étapes de croissance.

2.6 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique vibrationnelle utile à coupler avec la microfluidique. Tout comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman peut donner de l'information sur la composition en biomolécules du biofilm. Les bandes observées sont reliées aux transitions vibrationnelles des molécules présentes dans l'échantillon. Lorsqu'un photon interagit avec une molécule, il peut affecter son nuage électronique. En spectroscopie UV-visible et de fluorescence, le

photon provoque une transition entre le niveau fondamental et le premier niveau électronique excité alors qu'en spectroscopie infrarouge la transition se fait avec le premier niveau vibrationnel. Lorsque le photon a une énergie trop faible pour produire une transition électronique il est généralement rediffusé sans qu'il y ait de transfert d'énergie. Toutefois, une faible proportion (environ 1 sur 10 millions) interagira avec le nuage électronique et il y a diffusion inélastique. L'énergie perdue par le photon correspond alors à celle de la transition vibrationnelle excitée (Figure 2-3). Afin qu'une transition vibrationnelle soit active en Raman, cette dernière doit provoquer une variation du tenseur de polarisabilité de la molécule. La polarisabilité correspond à la capacité du nuage électronique à se distordre sous l'effet d'un champ électrique. Ainsi un mode vibrationnel n'induisant pas de changement de polarisabilité ne sera pas actif en spectroscopie Raman. À l'inverse si le tenseur de polarisabilité est fortement affecté, on observera une bande intense associée à la transition vibrationnelle.

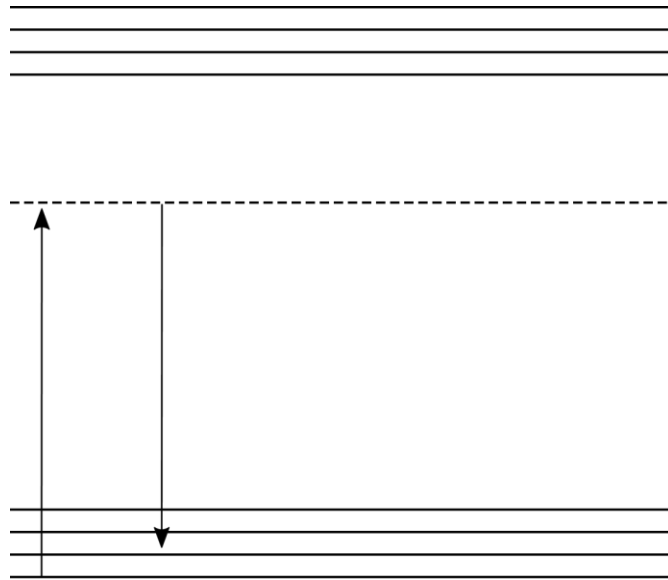


Figure 2-3 : Schéma représentation une transition Raman. La molécule à l'état fondamental est excitée jusqu'à un niveau virtuel (ligne pointillée) durant l'interaction d'un photon avec son nuage électronique. Diffusion d'un photon à une énergie plus faible que celle du photon initial. La différence d'énergie entre l'énergie des deux photons correspond à la différence d'énergie des deux niveaux vibrationnels.

2.6.1 Diffusion Raman exaltée par les surfaces (SERS)

Comme l'effet Raman a une faible efficacité, pour faire des mesures à faible concentration il faut recourir à certaines stratégies. L'une de celles couramment utilisées est la diffusion Raman exaltée par les surfaces [81, 82]. Cette technique exploite le phénomène d'excitation plasmonique. Lorsqu'une nanoparticule ou une surface nanostructurée est soumise à un faisceau lumineux de longueur d'onde appropriée, il peut y avoir une oscillation collective de son nuage électronique tel qu'illustré à la Figure 2-4. Le plasmon de surface provoque une augmentation locale importante du champ électrique [83]. Puisque l'efficacité de l'effet Raman est liée au champ électrique, il y aura augmentation de l'intensité des bandes observées par l'effet SERS. Plusieurs facteurs influencent le rehaussement par l'effet SERS. La taille et la forme des particules ainsi que la distance entre deux particules sont importants [83]. Pour cette raison, il faut contrôler la fabrication du substrat SERS et bien le caractériser.

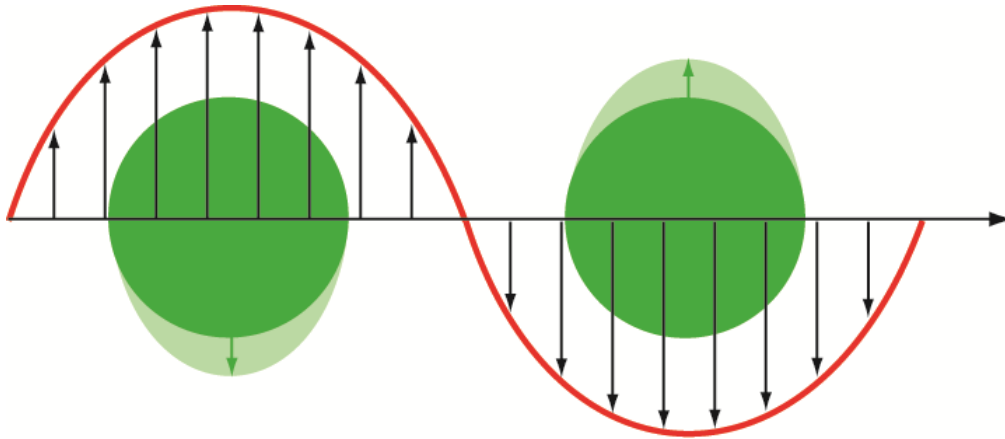


Figure 2-4 : Oscillation collective du nuage électronique d'une nanoparticule lors du passage d'une onde électromagnétique.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour avoir des surfaces efficaces pour le SERS. La plus commune est la synthèse de nanoparticules en solution. La méthode de synthèse et les conditions utilisées permettent un contrôle de la taille et de la distribution. En microfluidique, les nanoparticules suspendues en solution sont utilisées en les faisant circuler directement dans le microcanal [84-87]. Le mélange entre la solution de nanoparticules et l'échantillon à étudier dans le microcanal peut se faire par diffusion entre les deux écoulements ou à l'aide de mélangeurs actifs ou passifs. Il est possible d'augmenter l'efficacité en SERS en provoquant l'agrégation contrôlée des nanoparticules dans le microcanal [84]. Un des principaux problèmes de cette approche est l'accumulation de nanoparticules sur les murs du microcanal qui crée un effet de mémoire. Cela fait que l'augmentation par l'effet SERS peut changer dans le temps. De plus, il est nécessaire de faire circuler les nanoparticules pendant toute la durée des mesures. Dans le cas d'une expérience courte cela n'est pas problématique, mais pour de longues expérimentations, cela nécessite un grand volume de solution de nanoparticules.

Pour éviter ces différents problèmes, une surface active en SERS intégrée au fond du microcanal est utilisée. Cela donne une plus grande stabilité à la structure

puisque l'on évite les problèmes d'agrégation et on obtient un dépôt uniquement à l'endroit où on veut faire les mesures. Différentes méthodes sont utilisées dans la littérature pour fabriquer des surfaces actives en SERS comme la photo réduction de précurseurs d'argent [88, 89], le recuit thermique de surface d'or [90] et la déposition d'or ou d'argent sur une surface nanostructurée [91-95].