



Méthodes spectroscopiques et optiques pour le suivi de la croissance des biofilms en milieu microfluidique

Thèse

François Paquet-Mercier

Doctorat en chimie

Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© François Paquet-Mercier, 2018

Méthodes spectroscopiques et optiques pour le suivi de la croissance des biofilms en milieu microfluidique

Thèse

François Paquet-Mercier

Sous la direction de :

Jesse Greener, directeur de recherche

Résumé

Les biofilms sont largement répandus dans la plupart des écosystèmes terrestres. Ils peuvent être formés par la plupart des microorganismes. Dans le cadre de cette thèse, les biofilms bactériens, plus spécifiquement ceux formés par la bactérie *Pseudomonas sp.* CT07, ont été étudiés. Ils ont plusieurs rôles, utiles ou nuisibles, pour la santé humaine, l'agriculture et l'industrie. Contrairement aux bactéries planctoniques qui peuvent nager librement, les bactéries sessiles s'attachent aux surfaces où elles peuvent former des biofilms. Pendant ce processus, elles produisent une matrice extracellulaire faite de, mais pas exclusivement, polysaccharides, de protéines, d'ADN et d'ARN. Les propriétés mécaniques de la matrice rendent le biofilm très résilient à son environnement. Elle est viscoélastique et les bactéries peuvent modifier de manière dynamique les propriétés mécaniques du biofilm. La grande variété de groupements fonctionnels disponibles grâce aux différentes biomolécules qui sont présentes dans la matrice permettent de piéger des molécules organiques et les ions dissous. Cela est responsable de plusieurs mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

L'objectif principal de cette thèse est de concevoir de nouvelles méthodologies analytiques pour étudier les biofilms et obtenir plus d'informations sur leur structure et ce qui peut les influencer. La spectroscopie infrarouge et la microscopie optique ont été utilisées dans des canaux microfluidiques pour suivre la croissance des biofilms. La combinaison des deux techniques permet l'obtention d'informations sur la composition en différentes biomacromolécules et sur la structure du biofilm. Ces méthodes ont permis d'évaluer l'efficacité de l'inoculation directe et de l'inoculation par un biofilm en amont. L'utilisation de microcanaux avec un faible rapport d'aspect a conduit en des différences importantes dans les conditions hydrodynamiques entre le centre du microcanal et ses coins. Dans cette configuration, les biofilms ont tendance à croître à partir des murs de côté qui sont plus courts. À cet endroit, les forces de cisaillement sont les plus faibles. La microscopie confocale intermittente montre la présence de canaux d'eau exempts de bactéries à l'intérieur d'un biofilm

à proximité du coin du microcanal. Nous émettons l'hypothèse que ce canal a un rôle important dans le transfert de masse à l'intérieur du biofilm lorsqu'il devient plus épais. Lorsque les biofilms des bactéries *Pseudomonas* croissent, leur structure peut être influencée par le type de milieu de culture. Les biofilms croissant dans les milieux complexes obtenus à partir d'extraits de levure peuvent former des structures allongées nommées *streamers* qui ont été analysées par microscopie confocale à balayage laser. L'imagerie en trois dimensions de ces structures dans des microcanaux droits est rapportée pour la première fois. Dans un milieu de culture minimal avec le citrate de sodium comme seule source de carbone, nous avons observé et quantifié des patrons fractals à la base du biofilm dans le temps. Nous avons aussi conçu un dispositif microfluidique pour l'étude *in situ* par spectroscopie Raman exaltée par les surfaces (SERS). Cette méthode permet d'avoir un signal Raman rehaussé et une sensibilité élevée pour le citrate de sodium, une source de carbone commune pour les bactéries, à faible concentration.

Les différentes méthodologies développées dans le cadre de cette thèse peuvent être appliquées à d'autres systèmes plus complexes dans le futur. La combinaison de la microfluidique pour le contrôle précis de l'écoulement ainsi que les mesures multiplexées dans des microcanaux en parallèle est la clé pour obtenir des indices importants et statistiquement pertinents sur la croissance des biofilms et les méthodes pour les contrôler.

Abstract

Biofilms are widely spread among most of earth ecosystems. They can be formed by a variety of microorganisms. In the scope of this thesis, bacterial biofilms, more specifically those formed by the bacterium *Pseudomonas sp.* CT07, have been studied. They have many roles, useful and harmful, for the human health, agriculture and industry. As opposed to planktonic bacteria that can swim freely, sessile bacteria are attached to surfaces where they can form biofilms. During this process, they produce an extracellular matrix made of, but not exclusively, polysaccharides, proteins, DNA and RNA. The mechanical properties of the matrix make the biofilm very resilient to its surrounding environment. It is viscoelastic, and the bacteria can dynamically modify the mechanical properties of the biofilm. The high variety of functional groups available due to the different biomolecules present allows trapping of organic molecules and dissolved ions by the matrix. This is responsible for multiple mechanism of resistance to antimicrobial by bacteria.

The main objective of this thesis is to develop new analytical methodologies to study biofilms and obtain more insights on the structure of biofilms and what can influence them. Infrared spectroscopy and optical microscopy were used in microfluidic channel to follow biofilm growth. The combination of the two techniques enabled acquisition of information on the composition in biomacromolecules and biofilm structure. These methods allowed to assess the efficiency of direct inoculation and inoculation from an upstream biofilm. The use of low aspect ratio channels resulted in strong differences in hydrodynamic conditions between the middle of the channel and the channel corners. In this configuration biofilms tended to grow from the short side-walls of microchannels where shear stress was lowest. Time-lapse confocal microscopy showed the presence of a biochannel inside the biofilm in the corner positions. It is hypothesized that this channel has an important role in mass transfer in biofilm as it grows thicker. As the biofilms of *Pseudomonas* bacteria grew, their structure could be influenced by the type of growth media. Biofilms grown in complex media obtained from yeast cell extract could form elongated structures called

streamers which were analysed with confocal laser scanning microscopy. Three-dimensional imaging of these structures in regular straight microchannels is the first of its kind. In a minimal medium with citrate as the sole carbon source, we observe and quantify time-dependant fractal patterns at the biofilm base. We have also developed a microfluidic device for *in situ* study by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). This method allows having enhanced Raman signal and high sensitivity of sodium citrate, a common carbon source for bacteria, at low concentration.

The different methodology developed in this thesis can be applied to more complex systems in the future. Combination of microfluidic for precise flow control and multiplexed measurement in massively parallelized channels is key to get deeper, statistically relevant insights in biofilm growth and methods to control them.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des abréviations.....	xi
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Remerciements	xxiv
Introduction.....	1
Intérêt pour la recherche.....	3
Objectifs du projet.....	4
Chapitre 1 : Biofilms.....	6
1.1 Composition des biofilms.....	6
1.2 Croissance des biofilms.....	7
1.3 Transfert de masse dans les biofilms	10
1.4 Impact des biofilms sur la résistance des bactéries aux environnements hostiles	12
1.5 Effet de l'écoulement sur les biofilms.....	14
Chapitre 2 : Techniques utilisées	16
2.1 Microfluidique.....	16
2.1.1 Utilisation de la microfluidique pour l'étude des biofilms	19
2.1.2 Méthodes pour la caractérisation dans les systèmes microfluidique	21
2.2 Microscopie	22
2.2.1 Mesures de densité optique.....	23
2.2.2 Utilisation de la microscopie pour l'étude des biofilms en microfluidique.....	24
2.3 Microscopie à fluorescence	25
2.3.1 Marqueurs fluorescents pour les biofilms	26
2.3.2 Protéine fluorescente verte (GFP)	26
2.3.3 Autres molécules pour le marquage des biofilms	27
2.4 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM).....	28
2.4.1 Utilisation de la microscopie confocale pour l'étude des biofilms.....	30

2.5	Spectroscopie infrarouge	31
2.5.1	Utilisation de la spectroscopie infrarouge pour l'étude des biofilms en microfluidique	33
2.6	Spectroscopie Raman	35
2.6.1	Diffusion Raman exaltée par les surfaces (SERS)	37
Chapitre 3 : Matériel et méthodes		40
3.1	Fabrication des dispositifs microfluidiques.....	40
3.1.1	Fabrication de moules par photolithographie	40
3.1.2	Fabrication des dispositifs par réplication d'un moule.....	42
3.2	Dispositif microfluidique pour les expériences en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée	44
3.3	Préparation des biofilms	45
3.3.1	Milieus de culture	45
3.3.2	Inoculation des biofilms	46
3.4	Traitement des spectres infrarouge	49
3.5	Microscopie confocale à balayage laser	50
3.5.1	Mesure d'aire occupée par les bactéries	50
3.5.2	Mesures de dimension fractale	52
3.6	Microscopie en champ clair	53
3.6.1	Analyse et traitement des images	53
3.7	SERS	57
3.7.1	Fabrication du dispositif	57
3.7.2	Préparation des surfaces pour les études SERS en microfluidique	59
3.7.3	Caractérisation des surfaces d'argent	61
3.7.4	Acquisition des spectres SERS	62
Chapitre 4 : Utilisation de la spectroscopie infrarouge et de la microscopie confocale pour l'étude des premières étapes de croissance....		63
4.1	Introduction	63
4.2	Suivi de la croissance par spectroscopie infrarouge	67
4.3	Absence de photoblanchiment pour les conditions d'acquisition utilisées en microscopie confocale	74
4.4	Suivi de la croissance par microscopie confocale à balayage laser	76
4.4.1	Aire occupée par les bactéries.....	79

4.5	Discussion	82
4.5.1	Suivi de la croissance des biofilms par spectroscopie infrarouge et microscopie confocale	82
4.5.2	Effet de la méthode d'inoculation.....	83
4.6	Conclusion.....	86
Chapitre 5 : Effet de la géométrie de la surface d'attache sur la croissance des biofilms		89
5.1	Introduction.....	89
5.2	Effet de la hauteur du microcanal sur la croissance à partir des côtés étudié par microscopie en champ clair.....	91
5.3	Accumulation préférentielle dans les coins.....	99
5.4	Conclusion.....	106
Chapitre 6 : Impact du milieu de culture sur la structure des biofilms de <i>Pseudomonas sp. CT07</i>		109
6.1	Introduction.....	109
6.2	Milieus de culture.....	109
6.3	Formation de <i>streamers</i> pour les biofilms cultivés en milieu LB ...	111
6.3.1	Résultats.....	112
6.4	Formation de structures compactes pour les biofilms en milieu de culture AB.	115
6.5	Conclusion.....	120
Chapitre 7 : Dispositif microfluidique pour l'étude <i>in situ</i> par spectroscopie Raman exaltée par les plasmons de surface (SERS)		122
7.1	Introduction.....	122
7.2	Profil d'écoulement dans le dispositif microfluidique.....	124
7.3	Caractérisation des surfaces d'argent	125
7.3.1	Calibration de la surface active SERS	129
7.4	Imagerie spectrale du citrate de sodium dans le microcanal	133
7.5	Conclusion.....	136
Conclusions et perspectives.....		137
Bibliographie.....		141
Annexe I : Schéma représentant le processus de traitement automatisé de la mesure d'aire occupée par les bactéries à partir des résultats en CLSM.....		151
Annexe II : Macro ImageJ pour les mesures d'aire occupée par les bactéries.		152

Annexe III : Macro ImageJ pour les mesures de dimension fractale 154

Liste des abréviations

<i>a</i>	Absorbance
<i>A</i>	Aire de la section transversale
AFM	Microscopie à force atomique
ATR	Réflexion totale atténuée
<i>b</i>	Longueur du parcours optique
<i>c</i>	Concentration
CLSM	Microscopie confocale à balayage laser
<i>d_p</i>	Profondeur de pénétration
<i>D_{aq}</i>	Coefficient de diffusion en milieu aqueux
<i>D_e</i>	Coefficient de diffusion effectif
GFP	Protéine fluorescente verte
<i>h</i>	Hauteur
<i>l</i>	Valeur de pixel sur l'image à analyser
<i>l₀</i>	Valeur de pixel sur l'image de référence
IR	Infrarouge
IR-ATR	Spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée
<i>l</i>	Largeur
<i>L</i>	Diamètre hydraulique
<i>n</i>	Indice de réfraction
O.D.	Densité optique
MCT	Tube photomultiplicateur
<i>Pe</i>	Nombre de Péclet
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PMT	Tube photomultiplicateur
<i>Q</i>	Débit d'un liquide
<i>Re</i>	Nombre de Reynolds
SERS	Diffusion Raman exaltée par les surfaces
ZnSe	Séléniure de zinc
δ	Vibration de déformation
ϵ	Coefficient d'absorptivité
γ_m	Vitesse de déformation moyenne
θ	Angle d'incidence
θ_c	Angle critique
μ	Viscosité dynamique
<i>v_a</i>	Vibration d'élongation asymétrique
<i>v_m</i>	Vélocité moyenne
<i>v_s</i>	Vibration d'élongation symétrique
<i>T_m</i>	Force de cisaillement moyenne

Liste des tableaux

Tableau 5-1 : Principales bandes observées dans le spectre infrarouge en réflexion totale atténuée d'un biofilm de <i>Pseudomonas sp.</i> CTO7 après 60 heures de croissance avec leurs attributions et les principales biomolécules qui y sont reliées [32, 111].	68
Tableau 6-1 : Vitesse moyenne (vm), force de cisaillement moyenne (τm) pour les canaux deux dispositifs utilisés et les débits du milieu de culture.	91

Liste des figures

- Figure 2-1 : Schéma représentant la composition d'un biofilm. Les différentes composantes (protéines, polysaccharides, ADN et bactéries) ne sont pas représentatives de la répartition exacte retrouvée dans un biofilm. Certaines molécules retrouvées dans les biofilms ne sont pas représentées..... 6
- Figure 2-2 : Modèle représentant les étapes de croissance : A) attachement initial réversible. B) formation de microcolonies et attachement irréversible, C) croissance rapide des colonies, D) biofilm mature et E) rupture partielle ou complète du biofilm. 8
- Figure 3-1 : 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]. 18
- Figure 3-2 : Schéma représentant un cristal infrarouge pour la spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée. 32
- Figure 3-3 : 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. 37
- Figure 3-4 : Oscillation collective du nuage électronique d'une nanoparticule lors du passage d'une onde électromagnétique..... 38
- Figure 4-1 : Mesure de la hauteur d'un canal préparé à partir d'un moule fait par photolithographie au laboratoire. Le moule a quatre couches du polymère photoactif. La micrographie a été acquise avec un microscope en champ clair Olympus IX73 et un objectif 2X. La ligne brisée rouge au-dessus du microcanal a été ajoutée afin de représenter la partie supérieure où la lamelle de verre sera placée. Cette ligne

correspond à l'extension de la partie de PDMS de chaque côté du canal. La barre d'échelle mesure 500 μm 42

Figure 4-2 : Fabrication d'un dispositif microfluidique. A) Moule avec canaux en négatif. B) Remplissage du moule avec un pré-élastomère de polydiméthylsiloxane suivi d'un chauffage à 70 °C pendant quatre heures. C) Le dispositif est découpé et décollé du moule. 43

Figure 4-3 : A) Schéma du dispositif microfluidique utilisé pour les études en spectroscopie IR-ATR. B) Photo du dispositif microfluidique sur l'accessoire ATR diamant utilisé pour les mesures. 45

Figure 4-4 : Montage pour faire l'inoculation à partir d'un biofilm en amont. La valve à gauche permet de sélectionner le liquide qui entrera dans le tube intermédiaire. Une entrée sert pour injecter l'inoculum lors de l'inoculation. La seconde permet de faire circuler le milieu de culture. La valve de droite permet soit de diriger le flux vers un contenant de rejet directement pendant la croissance du biofilm dans le tube intermédiaire, soit de diriger le flux vers le dispositif microfluidique. Lors de l'étape d'inoculation du tube intermédiaire, l'inoculum suit le chemin indiqué en rouge. Lors de l'étape de croissance du biofilm dans le tube intermédiaire, le milieu de culture AB suit le chemin en vert. Pour la croissance du biofilm dans le dispositif microfluidique, le milieu de culture AB suit le chemin en bleu. 48

Figure 4-5 : Plan XY extrait d'un empilement confocal d'un biofilm avant (A) et après (B) conversion en image binaire pour les mesures d'aire. La barre d'échelle mesure 50 μm 51

Figure 4-6 : Micrographie du microcanal A) avant l'inoculation et B) après 70 heures de croissance. C) Image de densité optique obtenue à partir de A) et B) avec l'équation 4-1. La barre d'échelle mesure 500 μm 54

Figure 4-7 : Schéma représentant le dispositif à deux étages qui est utilisé pour les expériences SERS. A) Vue dans la section transversale du dispositif dans le plan XZ. L'entrée 1 est utilisée pour introduire la solution de confinement (eau) représentée en rouge à un débit Q_1 . L'entrée 2 est utilisée pour introduire la solution de citrate de sodium représentée en bleu à un débit Q_2 . La solution rouge confine la solution bleue au fond du microcanal. B) Vue des deux niveaux dans le plan XY. La

jonction, les deux entrées et la sortie sont représentées par des cercles. C) Vue de la section transversale du canal principal (niveau 1) dans le plan YZ. Les murs du canal sont une pièce de PDMS (en gris) et sont couverts d'une couche métallique sur les murs de côtés (i, ii) et sur le fond du canal (iii). La couche métallique au fond du canal sert de surface SERS. Le quatrième mur est une lamelle de verre attachée au dispositif (iv). Le canal a les dimensions suivantes : $h = 305 \mu\text{m}$ et $l = 2 \text{ mm}$ (pas à l'échelle). D) Photographie du dispositif avec les tubes faisant circuler des solutions de colorant rouge et bleu aux entrées 1 et 2 respectivement. Le dispositif microfluidique est placé avec la lamelle de verre en haut afin de permettre l'accès pour les mesures en spectroscopie Raman (appareil équipé d'un microscope droit). Le support du dispositif permet d'avoir suffisamment d'espace pour connecter les tubes aux entrées et à la sortie à l'aide de joints coudés métalliques. 58

Figure 4-8 : Réaction entre le réactif de Tollens avec un aldéhyde en milieu aqueux basique pour former un acétate d'ammonium et un précipité d'argent métallique. 59

Figure 4-9 : Déposition de la surface d'argent par réduction autocatalytique. A) Protection des côtés du microcanal par du ruban adhésif (en rouge). B) Traitement plasma C) Remplissage du canal par la solution de déposition autocatalytique. D) Formation de la couche métallique. E) Rinçage du microcanal et séchage. F) Traitement plasma pour augmenter l'effet SERS. 61

Figure 5-1 : 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. 67

Figure 5-2 : Décomposition spectrale du spectre IR-ATR du biofilm montré à la Figure 5-1 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} 70

Figure 5-3 : 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 5-1 et le spectre correspondant est à la Figure 5-1.....	72
Figure 5-4 : Ratio entre la bande amide II et la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ pendant la croissance du biofilm. La bande amide II est principalement associée aux protéines alors que la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ est principalement reliée aux acides nucléiques.....	74
Figure 5-5 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 20 μm de l'empilement confocal d'un biofilm de <i>Pseudomonas sp.</i> CT07 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.	76
Figure 5-6 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 18 μm de l'empilement confocal du biofilm de <i>Pseudomonas sp.</i> 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 5-7. La barre d'échelle mesure 50 μm	77
Figure 5-7 : Profil d'intensité (échelle 12 bit) dans l'axe Z pour les régions du biofilm montrées à la Figure 5-6. 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 5-6 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 5-6 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	79
Figure 5-8 : 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.....	80
Figure 5-9 : 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. 81

Figure 5-10 : Courbe de croissance obtenue par A) spectroscopie infrarouge et B) microscopie confocale pour des biofilms en inoculation directe (bleu) et indirecte (orange)..... 84

Figure 5-11 : 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. 86

Figure 6-1 : Schéma représentant la section transversale d'un microcanal avec une portion de biofilm au coin (a) et au milieu d'un canal d'une largeur l et hauteur h . 90

Figure 6-2 : Images de densité optique obtenues à partir de mesures en microscopie en champ clair d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après croissance dans un microcanal d'une profondeur de 88 μm pendant A) 15, B) 45, C) 55 et D) 70 heures. Un milieu de culture AB modifié est utilisé et l'écoulement se fait de la gauche vers la droite dans le microcanal. La barre d'échelle en A) mesure 500 μm et est représentative pour toutes les images..... 94

Figure 6-3 : Courbe de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 40, 100, 200, 300, 400 et 500 μm du mur du microcanal d'une hauteur de 88 μm (respectivement en noir, gris, orange, rouge, bleu et vert). Les courbes de croissance sont générées à partir de la densité optique obtenue après le traitement des images en microscopie en champ clair. La ligne pointillée pour la courbe noire montre la région utilisée pour les mesures de taux de croissance dans la phase de croissance rapide du biofilm. 95

Figure 6-4 : Taux d'augmentation de la densité optique dans la phase de croissance rapide du biofilm pour différentes distances à partir du mur du microcanal. Les données pour des canaux de 88 et 145 μm sont représentées respectivement en bleu et orange. Les résultats pour les deux mesures correspondent à la moyenne de trois répliques et les barres d'erreur à leur écart type..... 96

Figure 6-5 : Projection dans l'axe Z d'un empilement confocal après 1, 6, 16 et 50 heures de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 dans un milieu de culture AB modifié (A, B, C et D respectivement). Le microcanal utilisé mesure 305 x 2000 μm . Les mesures de microscopie confocale sont réalisées sur une profondeur de 13 μm . Les axes X et Y sont identifiés en D et correspondent respectivement à la largeur du canal et la longueur. L'écoulement du milieu de culture dans le microcanal se fait du bas vers le haut de l'image. La ligne pointillée en D montre la section qui a été utilisée pour générer la tranche dans le plan XT à la Figure 6-8. La barre d'échelle en D mesure 50 μm et est représentative pour les autres images..... 100

Figure 6-6 : Intensité de la fluorescence pendant la croissance à 25, 50, 75, 100 et 125 μm du coin du microcanal (orange, gris, jaune, bleu et vert, respectivement). Chaque mesure est faite sur une fenêtre de 5 μm de largeur. 103

Figure 6-7 : Tranches dans le plan XZ du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 présenté à la Figure 6-5 à 1, 6, 16 et 50 heures de croissance (A, B, C et D, respectivement). L'axe X est selon la largeur l'axe Z est selon la hauteur du canal. Le mur du fond du microcanal se trouve en bas de chaque image et la ligne pointillée jaune marque la position du mur du côté. La barre d'échelle mesure 10 μm dans l'axe X et 2,5 μm dans l'axe Z. 104

Figure 6-8 : Tranche dans le plan Xt de la projection dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07. La tranche dans le plan Xt a été faite selon la ligne pointillée rouge à la Figure 6-5. L'axe X correspond à la section transversale. La barre d'échelle en X mesure 20 μm et celle en t correspond à 10 heures. 106

Figure 7-1 : Projection dans l'axe Z des empilement confocaux obtenus par microscopie confocale identifiant la formation de *streamer* dans le dispositif

microfluidique après 15 (A), 19,5 (B), 22,5 (C), 27 (D), 30 (E), 31,5 (F), 33 (G) et 34,5 (H) heures de croissance. Le biofilm est formé par les bactéries *Pseudomonas sp.* CT07 et un milieu de culture LB est utilisé. Les empilements confocaux ont été acquis avec un objectif 40x sur profondeur de 24 μm . Ces images ont été générées en calculant la moyenne des différents plans XY de l'image confocale afin de mieux observer le déplacement de ces structures. Les cercles verts indiquent la position de la base du *streamer*. Les cercles rouges indiquent la position de la tête du *streamer*. La ligne brisée orange en (B) marque la région utilisée pour générer les coupes dans l'axe Z à la Figure 7-2. L'écoulement du milieu de culture dans le microcanal se fait du bas vers le haut. La barre d'échelle mesure 25 μm 113

Figure 7-2 : Coupe dans l'axe Z de l'empilement confocal CLSM du *streamer* selon la ligne brisée orange à la Figure 7-1 après 15 (A), 19,5 (B), 22,5 (C), 27 (D), 30 (E), 31,5 (F), 33 (G) et 34,5 (H) heures de croissance. Les rectangles blancs indiquent la position de la base du *streamer*. Les rectangles rouges indiquent la position de la tête du *streamer*. Le fond du microcanal se retrouve du côté gauche des images et la direction de l'écoulement est du bas vers le haut. La barre d'échelle mesure 10 μm et est valide pour toutes les images. 114

Figure 7-3 : Projections dans l'axe Z de l'empilement confocal CLSM d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 1 (A), 11 (B), 33 (C) et 55 (D) heures après l'inoculation du microcanal. Un milieu de culture AB est utilisé. Les empilements confocaux ont été acquis avec un objectif 60x sur profondeur de 13 μm . Ces images ont été générées en calculant la moyenne des différents plans XY de l'image confocale afin de mieux observer le déplacement de ces structures. La barre d'échelle mesure 50 μm 117

Figure 7-4 : Projections dans l'axe Z sur les premiers 2,2 μm au-dessus du fond du microcanal dans l'empilement confocal CLSM d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 1 (A), 11 (B), 33 (C) et 55 (D) heures après l'inoculation du microcanal. Un milieu de culture AB est utilisé. La barre d'échelle mesure 50 μm 118

Figure 7-5 : Dimension fractale du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 pendant sa croissance en milieu de culture AB avec 10 mM de citrate de sodium à différentes profondeurs. 120

Figure 8-1 A) Micrographie en champ clair avec une caméra couleur pour un écoulement avec des liquides colorés avec des débits de 0,34 mL/h et 0,14 mL/h (en rouge et en bleu, respectivement). B) Valeurs de pixel normalisées pour les canaux bleu et rouge de la caméra couleur dans la section transversale du microcanal représentée par la ligne noire en A). Une étoile bleue montre les régions correspondant au liquide de confinement et une étoile rouge pour l'analyte. Les parties où les deux sont observés sont identifiés par une étoile avec les deux couleurs. La barre d'échelle dans A) mesure 500 μm 125

Figure 8-2 : Image AFM en mode de percussion de la surface nanostructurée d'argent avant (A) et après 20 minutes de traitement par un plasma d'air (B). L'échelle dans les plans X et Y est de 1 μm /division. Les images ont été acquises sur une aire de 100 μm^2 à une fréquence de balayage de 0,25 Hz..... 126

Figure 8-3 : Facteur de rugosité (R_a) des surfaces d'argent déterminé à partir des images AFM pour différents temps d'exposition à un plasma d'air..... 127

Figure 8-4 : A) Spectres UV-vis en réflectance diffuse de la surface nanostructurée d'argent après 1, 5, 10 et 19 minutes (courbes bleue, rouge, orange et verte, respectivement) de traitement plasma. Pour chaque spectre, le spectre de la surface d'argent après déposition a été utilisé comme référence. La ligne brisée verte correspond à la longueur d'onde du laser utilisé pour les mesures Raman. B) Intensité Raman pour la bande $\nu\text{C-COO}^-$ du citrate à 952 cm^{-1} à différents temps d'exposition au plasma avec la source d'excitation à 514,5 nm. Les barres d'erreur ont été générées pour des mesures séparées à différents endroits sur le même substrat. 128

Figure 8-5 : A) Déconvolution spectrale d'un spectre UV-visible en réflectance diffuse (ligne continue bleue) de la surface d'argent nanostructurée après exposition à un plasma d'air (600 mTorr, 29,6 W). Les trois bandes utilisées pour la déconvolution spectrale sont centrées à 397, 439 et 466 nm (lignes discontinues en orange, vert et noir, respectivement). B) Intensité des bandes à 397, 439 et 466 nm (points orange, carrés verts et triangles noirs, respectivement) obtenues par déconvolution des spectres à différents temps d'exposition au plasma. 129

Figure 8-6 : A) Spectres Raman du citrate de sodium sur la surface active SERS dans la région $\nu\text{C-COO}^-$ à des concentrations entre 0,1 et 5 mM. Les acquisitions ont été faites avec un laser vert à 514,5 nm à une puissance de 10 mW et un temps d'acquisition de 60 s. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande $\nu\text{O-H}$ de l'eau à 3535 cm^{-1} . Chaque spectre correspond à la moyenne de cinq spectres à la même concentration. B) Courbe de calibration pour le citrate de sodium à partir de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ à 952 cm^{-1} . L'écart type pour quatre mesures à chaque concentration a été utilisée pour les barres d'erreur..... 131

Figure 8-7 : Changement d'intensité de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ en Raman pour une solution 5 mM de citrate de sodium après avoir été remplacée par de l'eau. Initialement, la solution de citrate de sodium circulait par l'entrée 2 à 0,5 mL/h. Le débit à l'entrée 2 a été diminué à 0 mL/h tout en augmentant le débit d'eau dans l'entrée 1 à 0,5 mL/h. Les spectres ont été acquis en continu chaque 15 s avec un laser à 514,5 nm à une puissance de 10 mW. Le temps t, correspondant à près de trois minutes sur la figure indique le temps nécessaire pour que le système réponde. 132

Figure 8-8 : A) Micrographie du microcanal à la jonction entre les solutions d'eau (rouge) et citrate de sodium 5 mM (bleu) avec des débits de 0,34 et 0,15 mL/h, respectivement. B) Micrographie du biofilm de *Pseudomonas sp* CT07 confiné par l'écoulement après 48 h de croissance à 22 °C. C) Mesures de densité optique et SERS dans la section transversale de la solution de citrate de sodium et d'un biofilm confiné. Le profil de concentration du citrate de sodium (points noirs) a été mesurée sur la ligne noire indiquée en A). La concentration en citrate de sodium a été mesurée à partir de l'intensité normalisée de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ (952 cm^{-1}) et de la courbe de calibration déterminée précédemment (Figure 8-7 B). Les barres d'erreur proviennent de l'incertitude de la régression linéaire de la courbe de calibration. La ligne pointillée noire est utilisée en tant que repère visuel. Le profil par microscopie optique de la solution confinée dans la section transversale a été mesuré en déterminant les valeurs de pixel du canal bleu de la caméra qui correspondent à la solution bleue à différentes positions dans le microcanal et en calculant la moyenne (ligne bleue). La densité optique dans la section transversale du biofilm confiné

(ligne verte) a été mesurée à partir de micrographies acquises entre 48 et 56 heures après l'inoculation. Les barres d'échelles mesurent 500 μm 134

“Soon I’ll find the right words, they’ll be very simple”

-Jack Kerouac

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Jesse Greener, qui m'a permis de travailler sur ce projet. Les différents projets qu'on m'a confiés m'ont permis de connaître différents domaines de science que je n'aurais probablement pas découvert autrement. Merci de m'avoir fait confiance et transmis ton enthousiasme pour les projets et de m'avoir confié différentes responsabilités au sein du groupe. Être le premier étudiant au doctorat dans un nouveau groupe de recherche implique beaucoup de travail, mais c'est très formateur.

Je tiens aussi à remercier mes précédents directeurs de maîtrise, Michel Pérolet et Michèle Auger qui m'ont initié à la recherche et transmis leur passion dès le début de mes études. Tout ce que j'ai appris grâce à vous pendant cette période m'a aidé d'une manière ou d'une autre pour cette thèse.

Merci à Thierry Lefèvre, professionnel de recherche dans les groupes Pérolet et Auger, que j'ai côtoyé durant toute ma maîtrise et mon doctorat. Merci de m'avoir appris les bases de la spectroscopie vibrationnelles et partagé tes connaissances sur les méthodes de traitement de données. Merci à Jean-François Rioux-Dubé pour m'avoir formé et aidé pour l'utilisation des instruments de spectroscopie infrarouge et Raman au début de ma thèse. Cela m'a été bien utile pour toutes les expériences faites sur ces instruments.

Je tiens aussi à remercier les membres du groupe Greener que j'ai côtoyé pendant mes études pour avoir su créer une atmosphère agréable au laboratoire. Plus particulièrement, je tiens à remercier les étudiants stagiaires qui ont aidé pour différents projets. Merci aux membres du groupe Auger pour m'avoir accueilli dans leur bureau pour la fin de ma thèse et de m'avoir permis de les rejoindre pour participer à différentes activités de groupe ainsi qu'au tournoi de volleyball à plusieurs reprises.

Je tiens aussi à remercier le CERMA qui m'a permis non seulement d'utiliser les différents appareils qu'ils mettent à disposition des étudiants, mais aussi d'être

responsable de plusieurs appareils. En aidant différents étudiants pendant leurs projets et en étant responsable de ces appareils, j'ai acquis beaucoup de compétences. Merci au CRSNG pour ma bourse de recherche doctorale et aux différents organismes subventionnaires qui ont financé ces projets.

Merci également aux professeurs qui ont gracieusement accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et tous mes amis pour le soutien pendant toute la durée de mes études doctorales. Votre aide m'a permis d'affronter les difficultés rencontrées à différentes étapes de mon parcours. Je tiens à remercier tout particulièrement Magali qui a été présente pour me soutenir durant chaque étape de mes études. Ton soutien moral et ta compréhension ont su m'encourager et me faire persévérer. Avec la fin de mes études, je tiens à réaliser avec toi tous les projets donc nous rêvons et être heureux ensemble pendant de longues années.

Introduction

Les bactéries sont une des formes de vie la plus répandue sur la terre et sont responsables pour une grande part de l'activité biologique de divers écosystèmes. Elles jouent plusieurs rôles, bénéfiques ou nuisibles, pour la santé humaine, l'agriculture et l'industrie. Les bactéries peuvent exister sous la forme planctonique et sous la forme sessile. Dans la forme planctonique, les bactéries sont indépendantes les unes des autres et se déplacent en nageant ou par mouvements Browniens. Dans cette forme, les bactéries sont donc soumises aux courants dans les milieux liquides et peuvent être transportées d'un milieu à un autre. Cela favorise la propagation des bactéries, mais sous cette forme elles sont vulnérables aux substances pathogènes et incapables de faire face aux environnements inhospitaliers. Dans un biofilm, les bactéries sont sous la forme sessile, donc immobilisées sur un substrat. Les biofilms sont définis comme étant une communauté de microorganismes structurée et autoorganisée produisant une matrice extracellulaire protectrice et adhérent à une surface [1-3]. Il est important de considérer que pendant son existence, une bactérie peut être sous la forme sessile ou planctonique si les deux sont possibles. Ces formes sont effectivement deux phénotypes distincts dont les principales différences résident dans le métabolisme et les mécanismes de communication des bactéries. Les bactéries planctoniques utilisent aussi certains modes de transport actifs et passifs alors que celles sessiles sont plutôt immobilisées dans le biofilm. Elles interagissent ensemble par le biais de différentes molécules organiques servant de médiateurs et forment une communauté multicellulaire. La proximité des bactéries et la présence de la matrice extracellulaire qui permet de trapper ces molécules favorisent la détection du quorum dans les biofilms. Ce mode de communication repose sur des signaux moléculaires qui régulent l'expression ou la répression de certains gènes [4]. Dans sa définition globale, un biofilm est tout simplement un ensemble de microorganismes (bactéries, algues, champignons, protozoaires) adhérent entre eux et

avec une surface. L'interaction entre différentes espèces dans un biofilm peut être symbiotique ou compétitive [3]. Par exemple, dans certains biofilms mixtes des molécules produites par des bactéries peuvent être utilisées par une autre espèce. Plusieurs bactéries peuvent produire des substances antimicrobiennes ou qui interfèrent avec la détection du quorum afin de nuire à d'autres espèces dans un biofilms.

Une des propriétés des biofilms qui les rendent particulièrement intéressants à étudier est qu'ils sont fortement influencés par leur environnement et peuvent le modifier par leur croissance ou par leur métabolisme [5]. Un des bons exemples est l'interaction bidirectionnelle avec les conditions d'écoulement. Le débit, la présence d'un flux laminaire ou turbulent et les forces de cisaillement sont certains des facteurs déterminants pour la croissance du biofilm et des bactéries qui le composent. Pour un biofilm déjà établi, un changement dans une de ces variables provoquera une réponse rapide du biofilm. D'un autre côté, autant son épaisseur, sa morphologie que sa densité ont un impact direct sur le débit et sur l'écoulement à sa surface et à l'intérieur [6, 7]. Les forces de cisaillement dans le milieu sont connues pour provoquer l'érosion, mais d'un autre côté la présence d'un écoulement favorise l'entrée de nutriments dans le biofilm et l'élimination des sous-produits [8]. Certaines structures formées par le biofilm peuvent aussi affecter comment le liquide circule dedans et autour de ce dernier [9]. Il existe aussi une relation bidirectionnelle avec l'environnement chimique. Les biofilms peuvent modifier et dégrader le substrat sur lequel ils se forment alors que ce dernier a un effet important pour leur attachement. Les nutriments se trouvant dans le milieu aqueux seront dégradés par les bactéries ou les enzymes dans la matrice extracellulaire qui produiront d'autres molécules lors du métabolisme [5]. Ces molécules peuvent alors affecter l'environnement du biofilm et être utilisées par d'autres organismes pour lesquels ils sont essentiels [3]. Il est donc impératif de concevoir des méthodes analytiques en milieu contrôlé pour suivre la croissance des biofilms et les facteurs physico-chimiques qui les influencent.

Intérêt pour la recherche

Les biofilms forment une partie importante et vitale de plusieurs écosystèmes. Toutefois, l'accumulation de bactéries est problématique dans les milieux médicaux et industriels [1, 10, 11]. Les biofilms sont la source de plusieurs infections contractées dans des établissements de santé ou suite à des opérations et sont reliés à divers mécanismes de résistance aux antibactériens [11]. La matrice extracellulaire rend aussi les surfaces contaminées plus difficiles à nettoyer. Les biofilms se propagent préférentiellement dans les milieux propices aux bactéries qui le composent. Les bactéries peuvent toutefois adapter leur métabolisme et changer leur environnement. Cela peut entraîner la corrosion et la dégradation des structures fabriquées par l'être humain comme les bateaux, les systèmes d'égout, les bâtiments et les monuments historiques [12, 13]. Les structures naturelles sont aussi affectées par les biofilms.

La formation de biofilm peut provoquer l'obturation de canalisations et bloquer les pores de filtres [14]. Cela augmente le coût de fonctionnement des installations de traitement d'eau et affecte l'industrie alimentaire. Il y a un risque pour la population lorsque les biofilms ne sont pas bien contrôlés dans ces milieux [15]. Les efforts considérables qu'il faut déployer pour maintenir les systèmes et structures affectés par les biofilms en bon état de fonctionnement et les nettoyer continuellement amènent des coûts importants. L'accumulation de biofilms sur la surface des bateaux, aussi connue sous le terme de bioencrassement, induit des coûts de transport plus élevés en augmentant les besoins énergétiques, ce qui résulte en une production de CO₂ plus élevée. Les biofilms favorisent aussi l'attachement d'autres organismes comme les moules zébrées, certaines algues et plantes [16].

Pour le secteur médical, les infections reliées aux biofilms et la résistance bactérienne sont particulièrement problématiques [3, 17, 18]. Plusieurs infections contractées pendant des séjours dans les hôpitaux sont provoquées par des bactéries formant des biofilms. La difficulté à les éliminer complètement pose un risque pour les infections et des rejets pour les implants. En 1982, le premier cas

d'infection relié à un dispositif implanté relié à un biofilm (*Staphylococcus aureus*) a été identifié [19]. Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent former des biofilms dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique[20]. La recherche d'antibiotiques basés sur de nouveaux mécanismes d'action est rendue nécessaire par la résistance bactérienne. Puisque les biofilms sont impliqués dans ce processus, il serait préférable de trouver de nouvelles méthodes pour étudier les bactéries sous cette forme. Une grande partie des études et des tests sur les agents antimicrobiens sont présentement faits avec des bactéries sous la forme planctonique ou dans des conditions statiques dans les vases de Pétri, ce qui ne représente pas la réalité. De nouvelles méthodes pour étudier la croissance et suivre dans le temps les biofilms doivent donc être développées.

Objectifs du projet

Dans le cadre de ces travaux, les biofilms seront étudiés dans des systèmes microfluidiques afin de pouvoir contrôler précisément leur environnement chimique et physique. Pour ce faire, différentes méthodes analytiques optiques et spectroscopiques permettant leur étude *in situ* dans des microcanaux seront développées et évaluées. Elles seront par la suite utilisées afin de mieux comprendre la croissance des biofilms, leur structure et les facteurs qui les influencent. Ces techniques pourront être utilisées dans le futur pour évaluer différentes méthodes pour contrôler la croissance des biofilms.

La microscopie confocale et la spectroscopie infrarouge serviront d'abord à mieux caractériser leurs premières étapes de croissance du biofilm. L'impact de la méthode d'inoculation sur leur croissance sera aussi évalué. Ensuite, la microscopie en champ clair et la microscopie confocale permettront de mieux comprendre la croissance des biofilms dans les canaux microfluidiques. Plus particulièrement, l'impact de la taille des microcanaux rectangulaires et des coins sur la croissance seront étudiés. La formation de canaux à l'intérieur d'un biofilm sera aussi suivie. La

microscopie confocale sera ensuite utilisée pour suivre l'effet du milieu de culture sur la croissance. Un milieu complexe (LB) et milieu minimal (AB) seront étudiés. Enfin, un dispositif microfluidique permettant de faire des mesures par spectroscopie Raman exaltée par les surfaces sera développé. Il sera testé avec une solution de citrate de sodium qui est la source de carbone dans le milieu de culture AB. Ce dispositif pourra être utilisé dans le futur pour mesurer avec précision la concentration de différents analytes peu concentrés dans l'effluent de biofilms.

Chapitre 1 : Biofilms

1.1 Composition des biofilms

Typiquement, les biofilms incluent les bactéries et leur matrice extracellulaire. Tel que représenté à la Figure 1-1, la matrice extracellulaire est principalement composée de différentes biomacromolécules telles que les polysaccharides, protéines et glycoprotéines [1, 21]. On peut aussi y retrouver des lipides et de l'ADN et ARN extracellulaires, quoiqu'en plus faible quantité. La composition exacte varie amplement selon le type de bactérie et l'environnement du biofilm. Par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* exprime le polysaccharide cationique Pel qui se lie à l'ADN et l'ARN extracellulaires, modifiant ainsi les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire [21, 22].

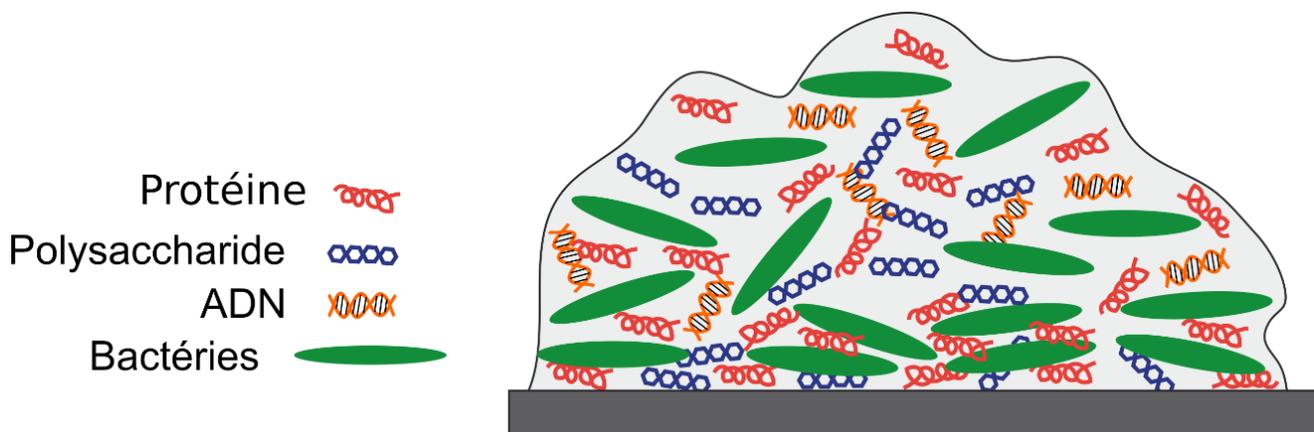


Figure 1-1 : Schéma représentant la composition d'un biofilm. Les différentes composantes (protéines, polysaccharides, ADN et bactéries) ne sont pas représentatives de la répartition exacte retrouvée dans un biofilm. Certaines molécules retrouvées dans les biofilms ne sont pas représentées.

La matrice extracellulaire confère une cohésion importante au biofilm. Elle a de bonnes propriétés viscoélastiques et les bactéries ont la possibilité de moduler ses

propriétés mécaniques en réponse à un stress externe. Après une augmentation des forces de cisaillement imposées, le temps de relaxation élastique des biofilms est 18 minutes [23]. Ce temps de réponse à un stress imposé aux biofilms est commun pour plusieurs espèces et correspond au temps de réponse phénotypique des bactéries à un changement d'environnement chimique. De plus, il a été démontré que les propriétés mécaniques de plusieurs biofilms sont affectées par la présence de certains sels. L'ajout de cations monovalents (Na^+ et K^+) et divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) dans un milieu augmente la viscosité apparente des biofilms de *Pseudomonas* alors que les ions trivalents (Fe^{3+} et Al^{3+}) la diminuent [24-26]. Dans le cas des ions monovalents et divalents cet effet est relié à une perturbation des forces électrostatiques et hydrophobes. En temps normal, les ions divalents permettent de réticuler et de rigidifier les polysaccharides de la matrice extracellulaire tel que l'alginate. Dans ce cas, cet effet est observé puisque dans un biofilm mature la matrice extracellulaire est complètement saturée en ions divalents. Les ions trivalents peuvent rigidifier un biofilm puisque ces derniers ne sont généralement pas saturés à maturité.

Les biofilms peuvent modifier leur environnement en favorisant la dissolution ou la précipitation de certains minéraux [2]. Ils peuvent aussi bloquer un milieu poreux ou des tuyaux, ce qui entraîne une modification de l'écoulement. La présence de différentes biomolécules et de molécules organiques adsorbées dans le biofilm en fait aussi une bonne source de nourriture pour les bactéries pour les périodes où l'environnement change pour un milieu pauvre en matière organique [27].

1.2 Croissance des biofilms

Tel que représenté à la Figure 1-2, le modèle classique utilisé pour représenter la croissance des biofilms comprend les cinq étapes suivantes : attachement initial réversible de bactéries, formation de microcolonies en surface et attachement irréversible, croissance rapide des colonies bactériennes, maturation du biofilm et

finalement, rupture du biofilm ou libération de bactéries à partir des microcolonies [28]. Il a été récemment démontré que la libération des bactéries se produit à toutes les étapes de la croissance des biofilms [8]. Malgré les travaux faits au cours des dernières années pour mieux connaître les biofilms, ces différentes étapes ne sont pas encore bien comprises. Les premières étapes de croissance (attachement initial, formation de microcolonies et croissance rapide) sont déterminantes pour la structure du biofilm final et nécessitent d'être étudiées davantage.

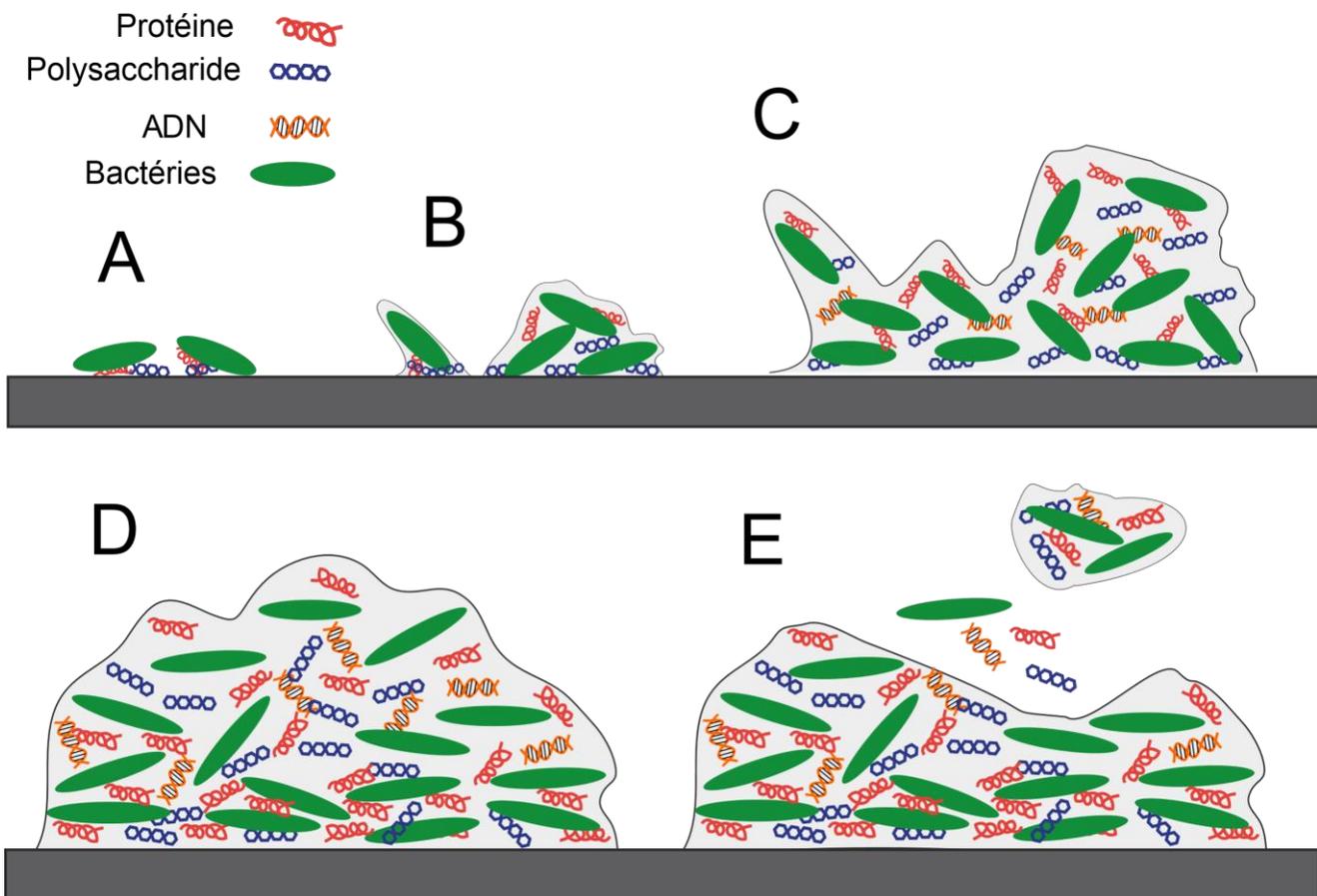


Figure 1-2 : Modèle représentant les étapes de croissance : A) attachement initial réversible. B) formation de microcolonies et attachement irréversible, C) croissance rapide des colonies, D) biofilm mature et E) rupture partielle ou complète du biofilm.

D'abord, lors de l'attachement initial réversible des bactéries, ces dernières s'attachent directement à la surface où à une couche de conditionnement à l'aide de

glycoprotéines présentes à leurs surfaces. La couche de conditionnement est généralement constituée de différentes biomolécules telles que les protéines et les polysaccharides. Elle est produite par les bactéries ou autres organismes présents dans le milieu environnant. La formation de la couche de conditionnement est cruciale pour l'attachement initial des bactéries sur les surfaces qui ne sont pas propices à l'attachement et la croissance. Cela permet, entre autres, à certains biofilms de se former sur des surfaces antiadhésives comme le téflon [29]. À cette étape, les bactéries sont encore légèrement mobiles et peuvent se retirer de la surface. Ensuite, chaque bactérie qui a adhéré à la surface commence à se répliquer pour former une microcolonie. À cette étape, il y a une production importante de glycoprotéines permettant l'adhésion irréversible à la surface [30]. Lorsque les conditions sont propices, il y a réplification rapide des bactéries et production de la matrice extracellulaire. Par la suite, les microcolonies mûrissent et forment différents types de structures en fonction de leur environnement et du type de bactéries. Lorsque les biofilms sont matures, il peut y avoir rupture partielle du biofilm, ce qui provoque sa dispersion. Il est important de noter que la dispersion du biofilm peut aussi se produire pendant chaque étape de sa croissance [8].

Lors des différentes étapes de croissance des biofilms, leur composition varie grandement. Plusieurs facteurs influencent la dispersion comme les forces de cisaillement, certaines enzymes pouvant dégrader la matrice extracellulaire, la présence de surfactants ou de chélatants, des molécules induisant un signal de détection du quorum et le changement des conditions environnementales. Ce dernier facteur inclut la concentration en oxygène et en nutriments [5]. Les biomolécules impliquées dans le conditionnement de la surface et l'adhésion initiale sont différentes de celles retrouvées dans les bactéries et dans le biofilm. De plus, les changements du métabolisme des bactéries se traduisent par une variation dans la concentration en biomolécules comme les protéines, les polysaccharides, les phospholipides et les acides nucléiques. Ces changements ne sont pas observables directement en microscopie en champ clair et en microscopie à fluorescence. Pour cette raison, l'utilisation de techniques comme la spectroscopie infrarouge pendant

la croissance se révèle utile pour mieux suivre ces effets [31, 32]. Par ailleurs, il est important de considérer que ces étapes ne sont pas parfaitement définies. Ainsi, plusieurs étapes peuvent se chevaucher en même temps pour un biofilm sur une même surface. De multiples facteurs entrent en jeu dans la croissance des bactéries. De ce fait, certains matériaux favoriseront l'attachement alors que d'autres l'inhiberont. Sur un même substrat, les défauts en surface ont tendance à servir de point de départ pour l'attachement initial. L'environnement chimique (concentration en nutriments, agents pathogènes, biomolécules, molécules impliquées dans la détection du quorum) et physique (vélocité du liquide, topologie du substrat, forces de cisaillement, gradients de concentration) est déterminante pour la transition entre ces phases et favorise certains phénotypes dans des parties du biofilm. Le comportement global du biofilm est régi par un mécanisme complexe impliquant la communication entre les organismes qui le composent. Il peut y avoir communication à partir de différents médiateurs tels que de l'ADN extracellulaire et certains dérivés d'acides nucléiques. Un des processus les plus importants est la détection du quorum (*Quorum sensing*) [28, 33, 34].

1.3 Transfert de masse dans les biofilms

La manière dont les biofilms interagissent avec leur environnement est différente des bactéries planctoniques. Pour les bactéries planctoniques nageant librement dans un milieu aqueux, les phénomènes de diffusion ont une importance limitée. Les mouvements des bactéries leur permettent en effet de se déplacer en direction des endroits où la concentration en nutriments est plus élevée en fonction du gradient de concentration dans le milieu [35]. Leurs mouvements sont aussi affectés par la présence de surfaces. Il a aussi été démontré que le mouvement des bactéries planctoniques favorise le mélange dans la solution [36]. De plus, lorsque des bactéries se retrouvent dans un milieu turbulent, le principal mécanisme de transfert de masse est la convection et le mélange est efficace. Puisque le biofilm forme une

barrière physique empêchant les phénomènes de turbulence, les transferts de masse se font essentiellement par diffusion.

Dans un milieu où la diffusion est le principal mécanisme de transfert de masse, on peut considérer que la diffusion d'une molécule ou d'un ion est décrite par son coefficient de diffusion en milieu aqueux (D_{aq} ; m^2s^{-1}) [37]. Cela est seulement le cas si la diffusion n'est pas limitée par une autre substance. Le coefficient de diffusion effectif (D_e ; m^2s^{-1}) dans le biofilm sera toujours plus faible que celui en milieu aqueux à cause de la présence des bactéries, de la matrice extracellulaire et de toute particule ou bulle trappée par le biofilm. On retrouve d'autres facteurs limitants pour le transfert de masse dans un biofilm qui sont reliés au rôle actif des bactéries. Pour les molécules pouvant être consommées ou dégradées par le biofilm, la concentration à l'intérieur du biofilm prendra un temps plus élevé pour augmenter. Ainsi, on peut retrouver des zones très pauvres en nutriment ou en oxygène dans un biofilm [38, 39]. Plusieurs biofilms multi-espèces tirent profit de cet effet. Les biofilms mixtes contenant des bactéries aérobies, des fermenteurs et des anaérobies sont formés grâce au gradient d'oxygène produit. Dans les couches supérieures, on retrouve les bactéries aérobies qui ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme. Lorsque la concentration d'oxygène est faible, on retrouve des microorganismes utilisant la fermentation comme mode de production d'énergie. Dans les couches inférieures du biofilm, alors que tout l'oxygène a été consommé, on peut alors retrouver des bactéries anaérobies qui utilisent différents mécanismes impliquant des molécules autres que l'oxygène comme accepteur d'électrons pour la respiration cellulaire. La matrice extracellulaire impose une barrière pour le transfert de masse par diffusion et convection autant pour les molécules pénétrant le biofilm (nutriments, antibiotiques, biomolécule ou autres) que pour celles produites par les bactéries et devant être excrétées (métabolites). La présence de trous dans le biofilm peut augmenter le transfert de masse en favorisant la convection lorsque la vitesse de l'écoulement est grande [6, 7]. Dans ces conditions, la convection est le mode de transfert de masse dominant [40]. Pour certaines communautés bactériennes, certains mécanismes symbiotiques peuvent prendre

place. Dans ce cas, certains produits de dégradations d'un microorganisme peuvent être utilisés par d'autres espèces lors de leur métabolisme.

Bien que l'on considère que toutes les bactéries dans les biofilms soient sessiles, il a été démontré que pour certaines bactéries, il peut y avoir entre 0,1 et 1% de bactéries mobiles. Elles forment une sous-population au sein même du biofilm et peuvent nager à l'intérieur de pores, favorisant ainsi le transfert de masse dans la matrice extracellulaire [41]. Alors que pour des fins de simplification on considère les biofilms comme des agrégats de bactéries entourés d'une matrice extracellulaire, ils possèdent une structure interne complexe. On retrouve en effet des réseaux poreux interconnectés dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* qui facilitent le transfert de nutriments et l'élimination des déchets [42, 43].

1.4 Impact des biofilms sur la résistance des bactéries aux environnements hostiles

Les bactéries peuvent développer une résistance aux environnements hostiles au travers de différents mécanismes et les biofilms en font partie [44]. Les caractéristiques qui permettent de survivre à ces conditions peuvent être acquises par des mutations génétiques et seront transmises aux générations suivantes. Un des facteurs importants est relié à la tolérance accrue aux agents antibactériens dans la forme biofilm [18]. La tolérance correspond à l'habilité à survivre à l'exposition à un composé qui serait létal pour un organisme ne possédant pas ce trait. Ce phénomène est réversible et spécifique aux biofilms [3]. Un des mécanismes importants implique la diminution de la concentration effective des agents antimicrobiens dans le biofilm. La concentration élevée en polysaccharide et la présence d'acides humiques dans la matrice extracellulaire font qu'il y a une grande diversité de groupements fonctionnels dans l'environnement des bactéries. Les acides humiques sont des polyphénols de structure complexe. Ils peuvent être

produits par les bactéries par dégradation de la lignine se trouvant dans l'environnement [45]. Les nanoparticules organiques et inorganiques peuvent aussi être trappées dans les biofilms [46]. Plusieurs composés toxiques et diverses molécules se retrouvent trappés par la matrice extracellulaire [47, 48]. Donc, bien qu'une zone du biofilm soit exposée à une concentration élevée de ces composés, le gradient de concentration qui y est formé fait que certaines régions du biofilm sont soumises à des concentrations suffisamment faibles pour ne pas affecter les bactéries. Celles qui survivent à ces doses plus faibles sont alors susceptibles de transmettre certains gènes favorisant la résistance à ces composés. Cela s'applique pour les molécules organiques ainsi que pour certains métaux toxiques comme le mercure, le cuivre, le cadmium et le zinc [47-49]. Les micro-organismes peuvent aussi sécréter des enzymes dans la matrice extracellulaire afin de dégrader différentes molécules qui leur sont nocives. Cette capacité à fixer les métaux lourds et à dégrader des molécules organiques toxiques les rend intéressants pour la bioremédiation des eaux usées [48]. Ces effets combinés créent un gradient de concentration dans le biofilm. Plus une bactérie est enfouie dans le biofilm, plus la concentration effective en oxygène et en nutriments essentiels est faible. Cela fait que les bactéries se trouvant dans les couches inférieures sont souvent en état de dormance afin de réduire leur métabolisme, donc ont peu d'activité biochimique [3]. Puisque plusieurs antibactériens dépendent de l'activité de la bactérie, elles peuvent survivre et reformer le biofilm lorsqu'elles redeviennent actives et que les conditions redeviennent propices à leur multiplication. Les traits permettant à ces bactéries de mieux tolérer ces environnements sont ensuite hérités par les générations suivantes, les rendant ainsi résistantes.

Puisque le biofilm est fixé à un substrat, il peut être soumis à un changement soudain de son environnement. La matrice extracellulaire offre une tolérance accrue face à ces changements. Dans le cas où un biofilm se retrouve dans un milieu sec, il y aura production plus importante de polysaccharides spécifiques. Ces derniers ont la propriété d'absorber et de retenir l'eau. De plus, la couche supérieure de la matrice extracellulaire forme une sorte de peau lorsqu'elle sèche. Cela limite l'évaporation

de l'eau et protège ainsi le biofilm de la déshydratation [2, 30]. Certains polysaccharides hautement branchés inspirés de ceux produits dans la matrice extracellulaire peuvent même être utilisés sous forme de nanoparticules pour de nouvelles technologies et thérapies, notamment pour des crèmes hydratantes [50]. En cas de manque de nutriments et de molécules organiques à consommer pour assurer le métabolisme des bactéries, ces dernières peuvent sécréter des enzymes pour dégrader partiellement la matrice extracellulaire. Cela a pour effet de rendre disponible ces ressources pour les bactéries. Cela facilite aussi la rupture partielle du biofilm et l'éjection des bactéries. Ces dernières pourront alors se disperser dans le milieu environnant et former un nouveau biofilm à un endroit où les ressources sont suffisantes [2, 5].

1.5 Effet de l'écoulement sur les biofilms

Tel qu'énoncé précédemment, les biofilms sont très sensibles aux conditions environnementales. Un des facteurs importants est la présence ou l'absence d'un écoulement. De plus, les biofilms se comportent différemment si l'écoulement est laminaire ou turbulent. Le débit joue aussi un rôle important. Il a été démontré pour les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* qu'une plus grande concentration de bactéries se retrouve dans les couches supérieures du biofilm. De plus, lorsque le débit augmente, la proportion des bactéries dans le biofilm diminue. Enfin, les biofilms formés en présence d'un flux laminaire se développent plus facilement, mais ont moins de bactéries par unité de volume que ceux formés en présence d'un flux turbulent [51]. Ces changements peuvent aussi favoriser la formation de certaines structures dans le biofilm. En effet, la forme du biofilm a un effet important pour la diffusion et la convection. Une partie de ces effets sont reliés au transfert des nutriments et des déchets au sein du biofilm. Les nutriments présents dans le milieu environnant le biofilm sont davantage disponibles pour les bactéries des couches supérieures du biofilm puisqu'elles sont les premières à y avoir accès. La diffusion des déchets est aussi limitée dans les couches inférieures [8]. Les bactéries ont la

possibilité de modifier dynamiquement les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire par l'ajout, la modification ou la dégradation de différentes biomolécules en réaction à l'écoulement.

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

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

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

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

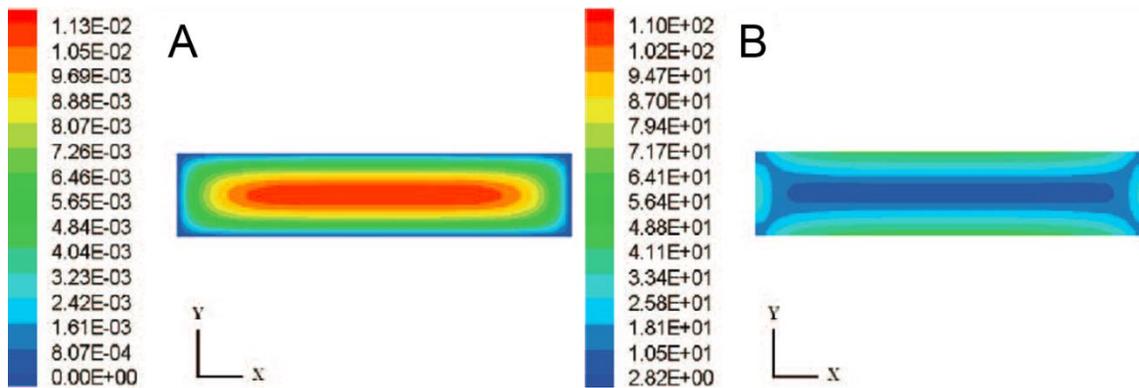


Figure 2-1 : Simulation computationnelle dynamique d'écoulement de la force de cisaillement dans la section transversale d'un canal microfluidique rectangulaire. On peut voir qu'à proximité des murs, la vitesse du liquide est nulle alors qu'elle est maximale au centre du canal. Les forces de cisaillement 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

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 reliés 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.

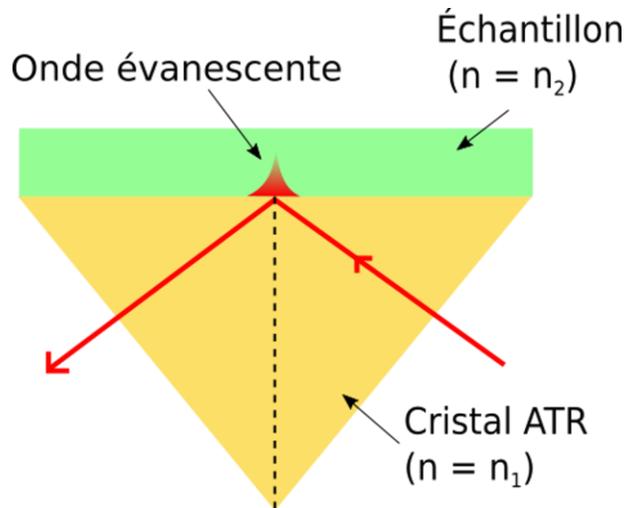


Figure 2-2 : Schéma représentant un cristal infrarouge pour la spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée.

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.

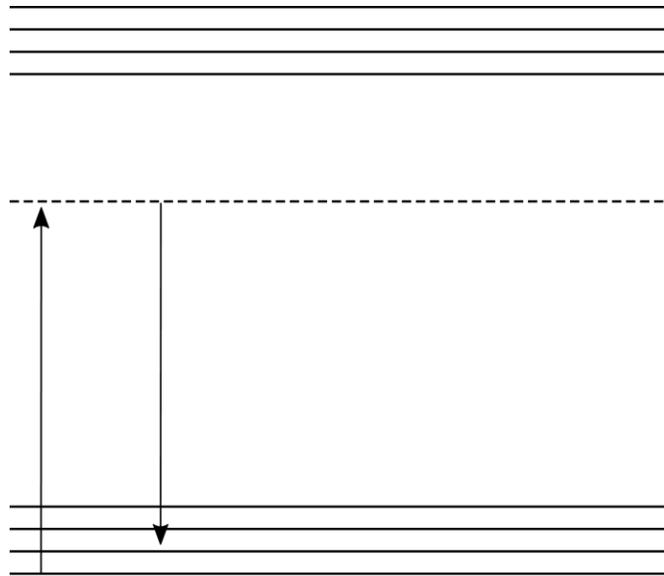


Figure 2-3 : Schéma représentation une transition Raman. La molécule à l'état fondamental est excitée jusqu'à un niveau virtuel (ligne pointillée) durant l'interaction d'un photon avec son nuage électronique. Diffusion d'un photon à une énergie plus faible que celle du photon initial. La différence d'énergie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

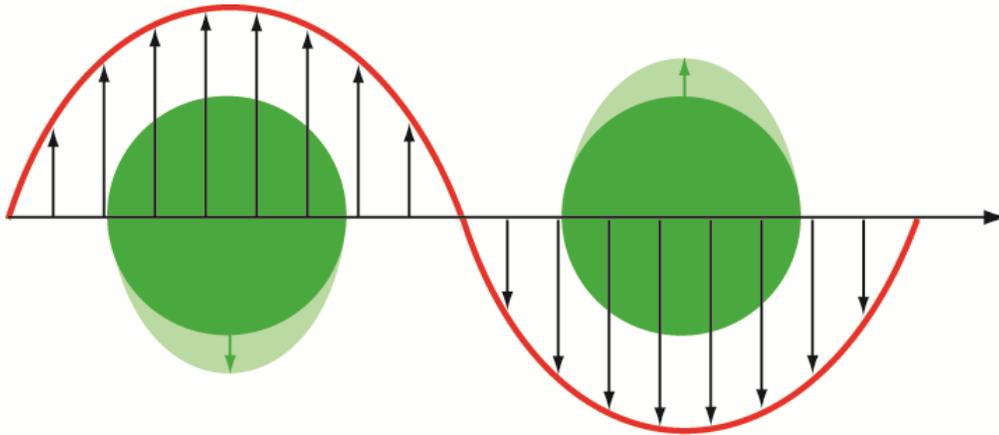


Figure 2-4 : Oscillation collective du nuage électronique d'une nanoparticule lors du passage d'une onde électromagnétique.

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].

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Fabrication des dispositifs microfluidiques

Les dispositifs microfluidiques sont fabriqués par réplique d'un moule avec un élastomère, une méthode analogue à la lithographie douce [96]. Essentiellement, un pré-élastomère est versé dans un moule puis réticulé afin d'obtenir un élastomère qui dans le cas présent est le polydiméthylsiloxane (PDMS). À ce moment, la pièce de PDMS est retirée du moule, des trous pour les connexions y sont percés et elle est scellée pour fabriquer un dispositif complet. Le moule utilisé est un négatif du microcanal. Le design de chaque dispositif a été d'abord dessiné dans le logiciel AutoCAD (Autodesk, CA, USA) avec toutes les dimensions appropriées.

Deux méthodes ont été utilisées pour la préparation des moules. Les moules utilisés pour fabriquer les dispositifs pour les expériences en spectroscopie infrarouge, microscopie confocale et spectroscopie Raman ont été préparés par dépôt par centrifugation d'une couche de SU-8 suivie de photolithographie [96]. Ces moules ont été préparés par la compagnie FlowJEM Inc. (Toronto, Canada) selon les designs que nous avons préparés. Pour les expériences en microscopie en champ clair, les moules ont été fabriqués au laboratoire selon la procédure décrite dans la section suivante.

3.1.1 Fabrication de moules par photolithographie

Pour la photolithographie, un polymère conçu pour polymériser sous l'effet de la lumière a été déposé sur une lame de verre de dimension 75x50x 1 mm³ (12-550C, Thermo Scientific, Canada). L'épaisseur du film de polymère est de 50 µm. Il a été laminé sur la lame de verre à l'aide d'un laminoir à chaud. Il est possible d'obtenir

un dispositif plus épais en laminant successivement plusieurs couches de ce polymère. Le masque négatif est alors déposé sur le film de polymère. Une lampe a été utilisée pour faire réticuler les régions exposées. Lorsque cette étape a été terminée, la lame de verre avec le polymère a été plongée dans une solution de développement à pH basique à partir d'une solution de carbonate de sodium 10% (m/v) pour dissoudre les parties non exposées n'ayant pas pu réticuler. Le moule a alors été rincé à l'eau déminéralisée puis fut mis à sécher à l'air libre pendant au moins 18 heures. Le moule a été finalement fixé dans un vase de pétri et a pu alors être utilisé pour former un dispositif microfluidique.

La profondeur des canaux des dispositifs ayant été formés par cette méthode dépend du nombre de couches du photopolymère et de l'étape de laminage. Cela a été déterminé par microscopie en champ clair. Pour chaque nouveau moule, un premier dispositif a été utilisé pour faire ces mesures. Une image de la section transversale du dispositif a été acquise, puis la distance entre le fond et le haut du canal a été mesurée à partir de la calibration du microscope (voir Figure 3-1). Le haut du microcanal a été identifié en traçant une ligne rejoignant chaque côté du dispositif. La moyenne de 10 mesures à différents endroits a été utilisée pour déterminer la profondeur du microcanal. On observe à la Figure 3-1 que les côtés du microcanal ne sont pas parfaitement droits et qu'ils forment un léger angle. Cela est dû à la méthode de fabrication. Lors de l'exposition à la lumière pour la photopolymérisation, il est possible qu'une partie passe en angle en dessous du masque. Cela fait que la base du moule est plus large que le haut. Les coins arrondis sont généralement reliés à l'étape de développement. Pour le procédé utilisé pour ces travaux le solvant utilisé nécessite beaucoup de temps pour que le processus soit complet. En général, cela provoque une dissolution non désirée du polymère réticulé dans les coins.

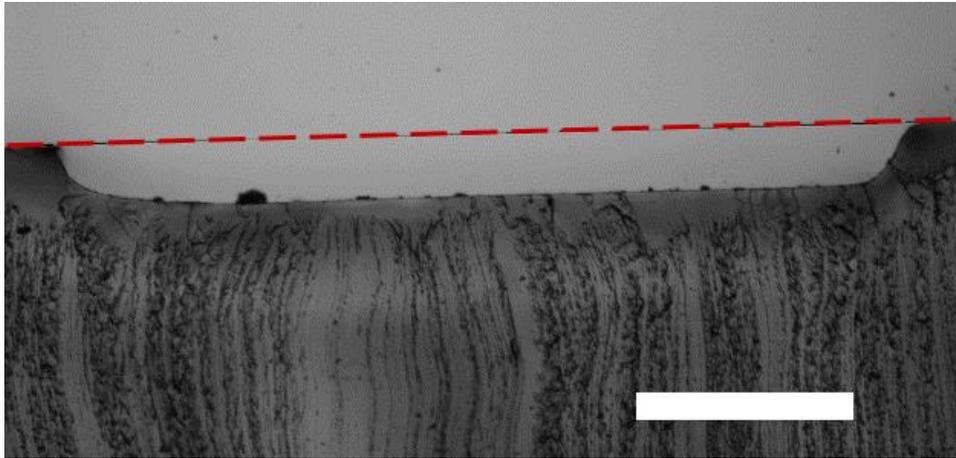


Figure 3-1 : Mesure de la hauteur d'un canal préparé à partir d'un moule fait par photolithographie au laboratoire. Le moule a quatre couches du polymère photoactif. La micrographie a été acquise avec un microscope en champ clair Olympus IX73 et un objectif 2X. La ligne brisée rouge au-dessus du microcanal a été ajoutée afin de représenter la partie supérieure où la lamelle de verre sera placée. Cette ligne correspond à l'extension de la partie de PDMS de chaque côté du canal. La barre d'échelle mesure 500 μm .

3.1.2 Fabrication des dispositifs par réplique d'un moule

La réplique d'un moule a été utilisée pour la fabrication des dispositifs microfluidiques utilisés dans le cadre des présents travaux. La Figure 3-2 illustre le procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique à partir d'un moule. Le microcanal a été obtenu en déposant un prépolymère de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) sur le moule puis en chauffant à 70 °C pendant quatre heures. Le mélange de pré-élastomère contient un agent réticulant qui permet la formation de l'élastomère réticulé solide lorsque chauffé. Le polydiméthylsiloxane est un polymère de la famille des polysiloxanes ou silicones dont l'unité de répétition de base est $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_n$. La chaîne latérale CH_3 rattachée à l'unité de base SiO lui confère des propriétés hydrophobes. Après réticulation, cet élastomère est flexible et stable à température ambiante. Il est aussi transparent dans les domaines visible et ultraviolet. Il est perméable aux gaz et plus particulièrement à l'oxygène et au CO_2 en plus d'être non-toxique pour les cellules, ce qui le rend utile pour les études avec les bactéries [96].

Les pièces de PDMS sont ensuite découpées et décollées du moule. Des trous sont percés dans la pièce de PDMS afin de créer une entrée et une sortie pour le microcanal. Pour les expériences en microscopie, le dispositif est ensuite scellé avec une lamelle de verre afin de former un microcanal fermé. Pour ce faire, les surfaces de PDMS et de verre sont traitées avec un plasma d'air pendant 90 secondes avec un appareil Plasma Cleaner (PCD-001, Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA) à une pression de 600 mTorr à une puissance de 29,6 W. Ce traitement nettoie les surfaces de verre et de PDMS en dégradant les molécules organiques qui y sont adsorbées. L'environnement oxydant du plasma provoque aussi la formation de groupements actifs à la surface du PDMS qui permettent d'adhérer à la surface du verre en faisant des liaisons chimiques. Lors de ce traitement, les groupements Si-CH₃ en surface du PDMS sont oxydés et forment des groupements silanol (Si-OH). Cela rend hydrophile la surface du PDMS. L'attachement irréversible entre le PDMS traité et la surface du verre se fait grâce à la formation de liens Si-O-Si [96].

Les solutions sont administrées à un débit contrôlé dans les dispositifs à partir de pompes à seringue (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Les connections entre les seringues et les dispositifs sont assurées par des tubes en perfluoroalkoxy (PFA ; U-1148, IDEX, WA, USA) et des assemblages de connecteurs (P-200x et P-658, IDEX, WA, USA).

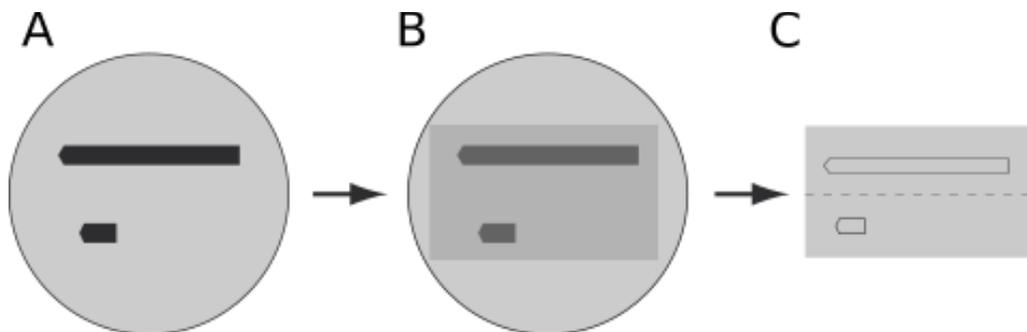


Figure 3-2 : Fabrication d'un dispositif microfluidique. A) Moule avec canaux en négatif. B) Remplissage du moule avec un pré-élastomère de polydiméthylsiloxane suivi d'un chauffage à 70 °C pendant quatre heures. C) Le dispositif est découpé et décollé du moule.

3.2 Dispositif microfluidique pour les expériences en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée

Les spectres infrarouges en ATR ont été acquis à l'aide d'un spectromètre infrarouge Nicolet Magna 850 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) avec un détecteur à bande étroite MCT refroidi à l'azote liquide et un accessoire ATR diamant (Golden Gate, Specac Ltd, London, UK).

Le dispositif scellé avec une lamelle de verre ne peut pas être utilisé pour les expériences en spectroscopie IR-ATR. Tel que mentionné précédemment, il faut que l'échantillon soit en contact direct avec le cristal ATR. Par conséquent, il a fallu concevoir un dispositif qui peut être placé directement sur le cristal de diamant. Ainsi, le dispositif en PDMS avec le canal est placé directement sur le support du cristal de diamant (Figure 3-3). Ce support est fait en carbure de tungstène et le cristal de diamant y est directement encastré. Puisque le cristal est au même niveau que le support, il n'y a pas de discontinuité qui pourrait influencer le flux dans le microcanal. Le cristal de diamant mesure $2 \times 2 \text{ mm}^2$. Le microcanal utilisé a les mêmes dimensions que celui utilisé pour les expériences en microscopie confocale ($2 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \times 400 \text{ }\mu\text{m}$). Le microcanal est placé avec précautions afin qu'il chevauche le cristal. Par conséquent, le PDMS ne touche en aucun point le cristal. Une plaque de plastique transparent est placée entre un objectif à faible magnification et le dispositif. Cet objectif est conçu pour appliquer une légère pression sur les échantillons. Cela permet d'obtenir un bon contact entre le dispositif et le support du cristal ATR et d'avoir un système étanche.

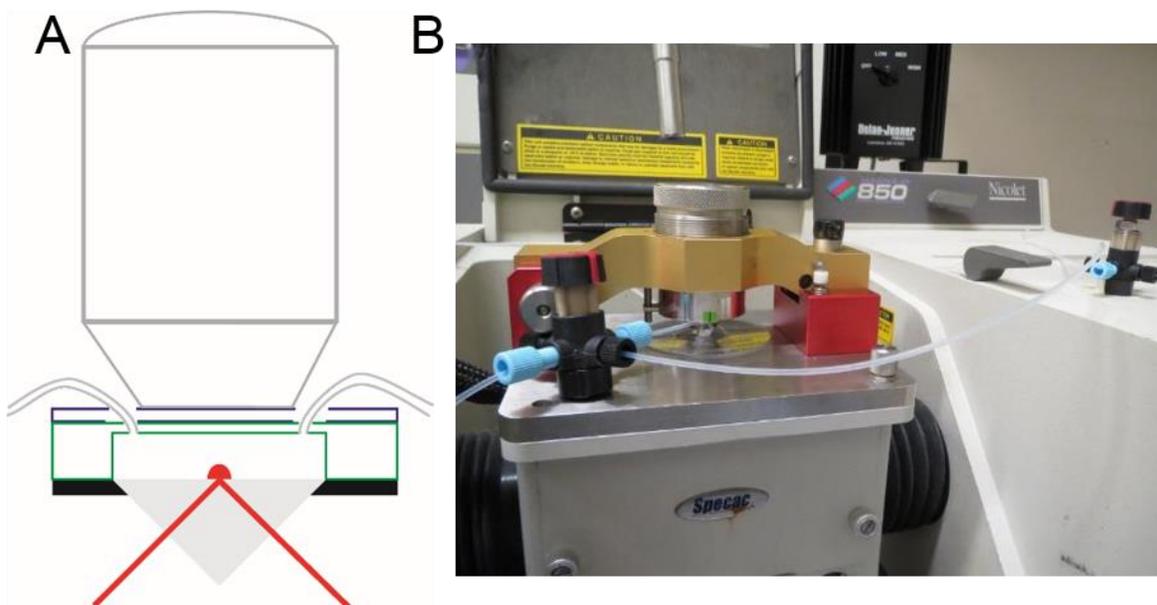


Figure 3-3 : A) Schéma du dispositif microfluidique utilisé pour les études en spectroscopie IR-ATR. B) Photo du dispositif microfluidique sur l'accessoire ATR diamant utilisé pour les mesures.

3.3 Préparation des biofilms

3.3.1 Milieux de culture

Pour les expériences en spectroscopie infrarouge et microscopie confocale, un milieu de culture AB modifié avec le citrate de sodium 10 mM comme source de carbone a été utilisé (1,51 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,37 mmol/L Na_2HPO_4 , 2,20 mmol/L KH_2PO_4 , 179 mmol/L NaCl , 0,1 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 0,001 mmol/L FeCl_3 ; Sigma Aldrich, Canada) [97]. Ce milieu de culture présente l'avantage d'être composé de minéraux comme source d'azote et de phosphore ainsi que d'autres oligo-éléments. Cela simplifie l'interprétation des spectres infrarouges puisqu'on évite ainsi d'avoir des bandes indésirables interférant avec celles du biofilm. Cela est particulièrement important puisque plusieurs milieux de culture communs utilisent des mélanges de protéines et d'extraits de levures. Leurs

spectres infrarouges sont alors très similaires à ceux du biofilm à cause de la présence de protéines, polysaccharides et d'acides nucléiques.

Pour les expériences en microscopie en champ clair, le milieu de culture Luria-Bertani (LB) a été choisi. Ce milieu de culture complexe est très répandu pour l'étude de différents types de microorganismes. Cette préparation consiste en une solution 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de NaCl. Le pH de la solution est ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution de NaOH. La grande variété d'articles publiés dans la littérature utilisant ce milieu de culture justifie ce choix pour les expériences en microscopie afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

3.3.2 Inoculation des biofilms

Tous les biofilms présentés dans ces travaux ont été préparés à partir de la bactérie *Pseudomonas* sp. CT07 dont un gène a été chromosomiquement intégré afin qu'elles expriment la protéine fluorescente verte (GFP) [70]. La souche de bactérie a été donnée gracieusement par le professeur Gideon Wolfaardt. Cette souche de bactérie de la famille *Pseudomonas* est à Gram négatif. Elle a une forme de bâtonnet et a des dimensions d'entre 4 et 5 µm par 1 µm [98]. Elle est comparable à la bactérie *Pseudomonas fluorescens* qui est naturellement présente dans la couche de sol où on trouve les racines des plantes. Cette bactérie pose aussi un problème dans le domaine alimentaire. Elle produit différentes lipases et protéases, ce qui accélère la dégradation des produits laitiers et de la viande [99].

Les bactéries sont d'abord cultivées à 30 °C pendant trois jours sur un pétri contenant un milieu de culture gélifié avec de l'agar. Les bactéries sont ensuite transférées dans un tube de culture contenant 3 mL de milieu de culture et incubées à 30 °C pendant 18 heures (pré-culture). Un agitateur orbital ajusté à 300 rpm est utilisé pour garder les bactéries en suspension pendant l'incubation. Cela permet de

laisser croître les bactéries dans le milieu de culture liquide et de s'assurer qu'elles sont actives pour l'inoculation dans le dispositif microfluidique.

Après l'assemblage, les tubes, les connecteurs, les valves et le dispositif microfluidique sont désinfectés avant le début de l'inoculation en faisant d'abord circuler une solution d'éthanol 70% à un débit de 1 mL/h pendant une heure. Tout le système est ensuite rincé à un débit de 1 mL/h avec de l'eau déminéralisée stérile (autoclavée) pendant 30 minutes, puis conditionné avec le milieu de culture pendant 30 minutes. Afin d'éviter la formation de bulles d'air dans le dispositif, les solutions introduites dans le dispositif sont dégazées en les mettant sous vide pendant 30 secondes avant de remplir les seringues.

Le montage illustré à la Figure 3-4 permet de faire l'inoculation du dispositif microfluidique à partir d'un biofilm en amont. Il existe plusieurs avantages à ce type d'inoculation. D'abord, cette méthode permet d'éviter d'introduire directement la solution utilisée pour la pré-culture dans le dispositif. Puisque la pré-culture dure 18 heures, cette solution accumule les déchets produits par les bactéries. Cela nous assure aussi que les bactéries qui inoculent le dispositif sont des bactéries étant dans la phase de croissance rapide et qu'elles sont prêtes à coloniser une nouvelle surface. Il a été démontré dans la littérature que les bactéries planctoniques ayant été récemment éjectées d'un biofilm ont tendance à former un biofilm plus rapidement [100, 101]. Après avoir désinfecté, rincé et conditionné le montage, la solution de pré-culture est injectée par l'entrée 1. Les valves 1 et 2 sont placées afin que la solution circule au travers du tube intermédiaire et se rende vers le tube conduisant au contenant de rejet. La solution de pré-culture est laissée sans débit dans le tube intermédiaire pendant 15 min afin de laisser suffisamment de temps aux bactéries pour qu'elles s'attachent à la surface du tube. Afin de faire croître un biofilm dans le tube intermédiaire, une solution de médium est introduite par l'entrée 2. Dans ce cas, la valve 1 est tournée afin de laisser passer la solution de média dans le tube intermédiaire. Après un délai dépendant du stade auquel on veut avoir notre biofilm dans le tube intermédiaire, on tourne la valve 2 afin de laisser circuler

le média qui traverse ce tube vers le dispositif microfluidique. Les bactéries se détachant de ce biofilm peuvent alors coloniser le microcanal.

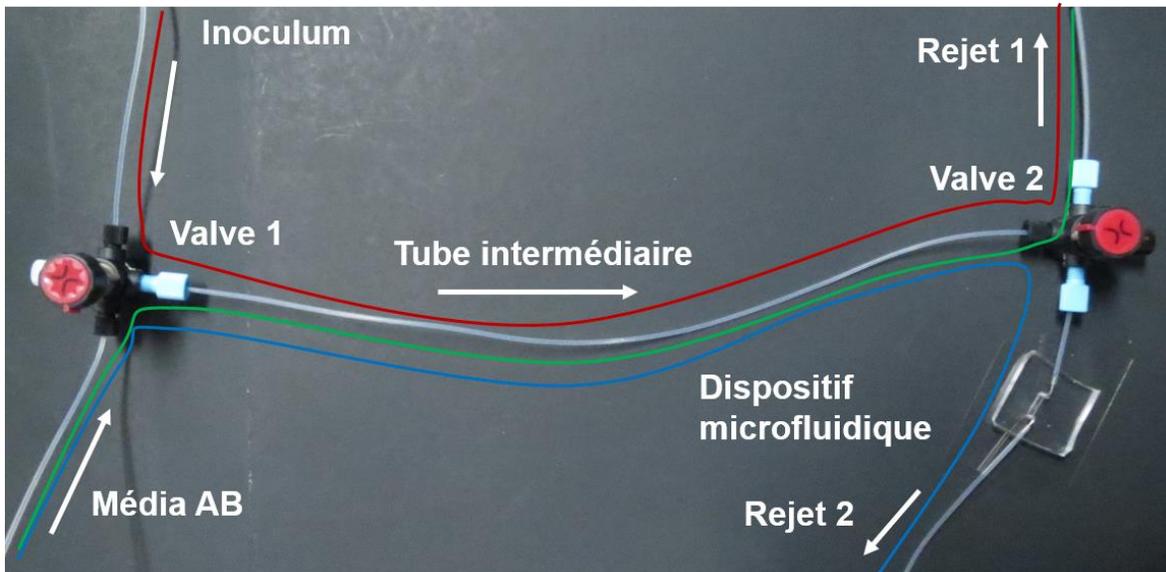


Figure 3-4 : Montage pour faire l'inoculation à partir d'un biofilm en amont. La valve à gauche permet de sélectionner le liquide qui entrera dans le tube intermédiaire. Une entrée sert pour injecter l'inoculum lors de l'inoculation. La seconde permet de faire circuler le milieu de culture. La valve de droite permet soit de diriger le flux vers un contenant de rejet directement pendant la croissance du biofilm dans le tube intermédiaire, soit de diriger le flux vers le dispositif microfluidique. Lors de l'étape d'inoculation du tube intermédiaire, l'inoculum suit le chemin indiqué en rouge. Lors de l'étape de croissance du biofilm dans le tube intermédiaire, le milieu de culture AB suit le chemin en vert. Pour la croissance du biofilm dans le dispositif microfluidique, le milieu de culture AB suit le chemin en bleu.

Pour l'inoculation directe, la solution de pré-culture des bactéries *Pseudomonas sp.* CT07 est directement injectée dans le microcanal pour l'inoculation. Pour ce faire, elle est d'abord prélevée à l'aide d'une seringue dans un environnement stérile. Après désinfection, rinçage et conditionnement du dispositif, la surface de PDMS est nettoyée à l'aide d'éthanol à 70%. La solution d'inoculum est alors injectée dans le canal en perçant au travers de la surface du PDMS. Après avoir retiré la seringue, la surface de PDMS se referme autour du trou et reste étanche. La surface du

dispositif est nettoyée à nouveau à l'éthanol 70%. La solution d'inoculum est laissée dans le dispositif pendant vingt minutes pour laisser suffisamment de temps aux bactéries pour atteindre la surface et s'y attacher. Finalement, la solution de nutriments est administrée au dispositif pour procéder à la croissance du biofilm.

3.4 Traitement des spectres infrarouge

Puisque les bandes de vibration de l'eau ont un coefficient d'absorption élevé et que le biofilm est hautement hydraté, il est nécessaire de procéder à la soustraction d'un spectre d'eau. Dans le cas présent, le spectre du milieu de culture est soustrait de chaque spectre acquis pendant la croissance. Ce spectre est acquis pendant le conditionnement du dispositif avec le milieu de culture. Puisque le biofilm et les bactéries sont majoritairement constituées d'eau provenant du milieu de culture, la soustraction du spectre du milieu de culture a été faite avec un facteur un. En évitant d'ajuster manuellement le facteur de soustraction, il a été possible d'automatiser le processus en créant une macro dans le logiciel Grams/Al 8.0. Plusieurs tests ont été faits avec un ajustement manuel du facteur de soustraction et les valeurs optimisées sont toujours très près d'un. Une ligne de base d'ordre zéro (décalage vertical) du spectre a été faite à 1850 cm^{-1} afin de s'assurer que tous les spectres partent au même point.

L'intensité de chaque bande infrarouge dans les spectres a été mesurée à partir de la fonction *Integrate* du logiciel Grams/Al 8.0. Pour chaque bande, une ligne de base linéaire locale à partir de ses deux extrémités est d'abord faite. Le logiciel donne ensuite des informations telles que la position du sommet de la bande, l'intensité, la largeur à mi-hauteur et l'aire intégrée de la bande. Après optimisation des paramètres pour les extrémités des bandes, une macro dans le logiciel Grams/Al a été faite afin de traiter tous les spectres. Les résultats sont ensuite importés dans le tableur Excel (2016) à l'aide d'une feuille de calcul permettant d'aller chercher

automatiquement les informations voulues. On peut ainsi suivre ces paramètres pendant le développement du biofilm.

3.5 Microscopie confocale à balayage laser

Les expériences CLSM ont été réalisées avec un microscope confocal FV1000 (Olympus). Pour toutes les expériences présentées, la protéine fluorescente verte, fluorophore exprimé par les bactéries, est excitée à 488 nm et la fluorescence est détectée entre 500 et 600 nm par un détecteur PMT et convertie avec une résolution d'intensité de 12-bit. Les empilements confocaux acquis sont traités à partir de l'ensemble Fiji pour le logiciel ImageJ [102]. Pour les différentes analyses, plusieurs macros ImageJ ont été écrites. Les différentes opérations faites automatiquement incluent la mesure d'aire, la compression dans le plan Z et la mesure d'épaisseur de biofilms.

3.5.1 Mesure d'aire occupée par les bactéries

L'aire occupée par les bactéries a été mesurée automatiquement à partir d'une macro ImageJ pour tous les plans XY de chaque image confocale acquise aux différents intervalles de temps durant l'expérience. Un schéma représentant les différentes étapes du traitement de données se trouve en Annexe I et le code se retrouve en Annexe II. La macro demande d'abord à l'utilisateur d'indiquer le dossier où sont situées les images à analyser. La première image confocale est importée, puis le premier plan XY de cette image est extrait. L'image est ensuite convertie en une image binaire (noir et blanc) afin de simplifier l'identification des bactéries dans le biofilm. Lors de cette opération, tous les pixels ayant une valeur supérieure à la valeur limite prédéterminée sont considérés comme noirs (présence de bactéries) et ceux en dessous de cette valeur sont considérés comme blancs (absence de

bactéries) (Figure 3-5). L'aire occupée par les bactéries est ensuite mesurée à partir de la fonction « Analyse Particules » d'ImageJ. Dans ce cas, l'aire de tous les éléments plus grands que 10 pixels carré est additionnée et est enregistrée. Cette valeur minimale permet d'exclure tous les pixels ou groupes de pixels associés au bruit dans la mesure. Il est important d'exclure ces pixels lors de cette étape puisque dans le cas contraire, ils seraient inclus dans la mesure d'aire et viendraient augmenter artificiellement les valeurs d'aires obtenues. Lorsque l'analyse du premier plan XY de la première image confocale est terminée, le processus d'analyse est fait en boucle pour tous les autres plans. Lorsque cette étape est terminée, la première image confocale est fermée par la macro et le processus est répété pour toutes les images confocales contenues dans le dossier défini par l'utilisateur. Les résultats obtenus sont compilés pour les différents plans XY de chaque point temporel.

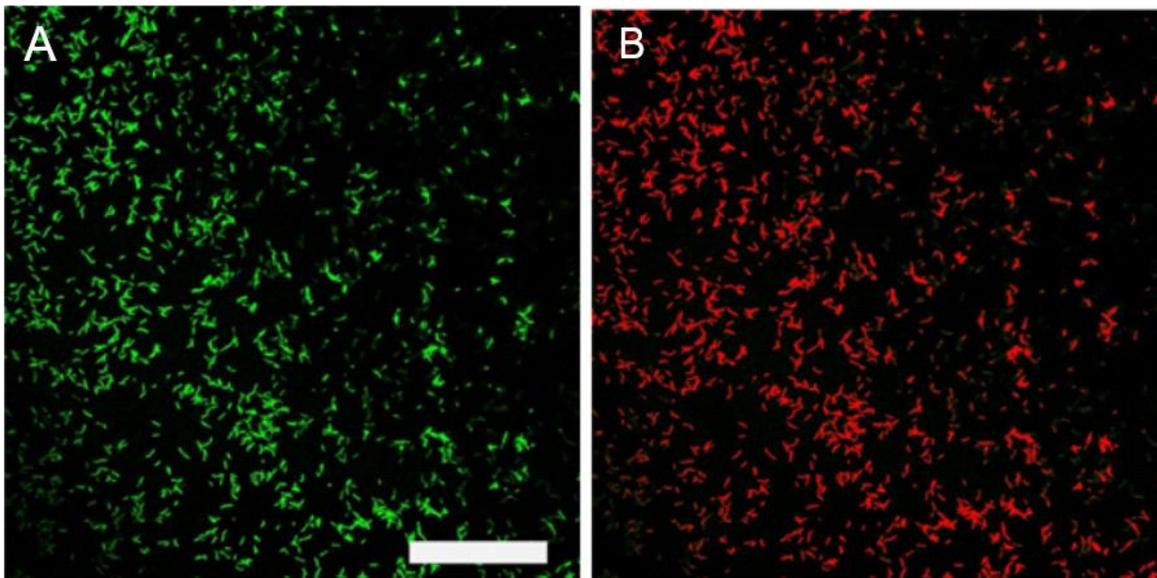


Figure 3-5 : Plan XY extrait d'un empilement confocal d'un biofilm avant (A) et après (B) conversion en image binaire pour les mesures d'aire. La barre d'échelle mesure 50 μm .

3.5.2 Mesures de dimension fractale

La dimension fractale est une mesure permettant de définir la dimensionnalité d'une structure. Ainsi, pour une droite cette valeur est d'un et pour un plan elle de deux. Les valeurs intermédiaires reflètent le caractère plutôt unidimensionnel ou bidimensionnel de la structure en fonction de si elle est près d'un ou de deux. Cette mesure est basée sur l'impact de l'échelle à laquelle on fait l'observation sur les détails perçus. Par exemple, si on divise une droite en segments ayant la moitié de la longueur originale, on obtient deux droites égales. Pour un carré, si on divise l'arrête en deux, on obtient quatre carrés de même dimension. Cette caractéristique est utilisée dans la littérature pour suivre la morphologie de biofilm et de déterminer si les structures sont compactes [103, 104].

La dimension fractale des biofilms observés par microscopie confocale a été mesuré automatiquement à partir d'une macro ImageJ. Cette dernière se retrouve en Annexe III. Pour commencer, l'utilisateur indique le dossier où se trouve les empilements confocaux à analyser. Le nombre de tranches dans l'empilement et le nombre sur lequel faire la moyenne est indiqué par l'utilisateur. Ensuite, la moyenne des premières tranches de l'empilement confocal à analyser est calculée. Cela permet de réduire le bruit sur les mesures. Les images résultantes sont converties en image binaire de la manière décrite dans la section précédente. La dimension fractale est finalement mesurée à l'aide de la fonction « Fractal Box Count » d'ImageJ. Pour cette fonction, l'image est divisée en un nombre de boîtes N. Le nombre de boîtes possédant des détails similaires à ceux observés dans l'image originale est alors déterminé. Le processus est alors fait avec un plus grand nombre de boîte. La dimension fractale est alors calculée à partir de ces valeurs. La macro consigne la valeur dans une matrice et une autre tranche de l'empilement confocal est analysée. Lorsque toutes les tranches sont analysées, le processus est répété pour tous les autres empilements confocaux se trouvant dans le dossier.

3.6 Microscopie en champ clair

Les expériences en microscopie en champ clair ont été faites avec un microscope Olympus IX73 équipé d'une caméra noir et blanc Infinity 3x (Lumenera, Ottawa, Canada) et d'une platine motorisée. Le contrôle de la caméra et de la platine est assuré par le logiciel ImagePro Plus 7 (Media Cybernetics, Rockville, MD, États-Unis). Une lame de verre avec une grille de calibration est utilisée afin de pouvoir calibrer les dimensions des images prises. Une macro dans le logiciel ImagePro Plus a été rédigée afin de pouvoir prendre des images sur différents canaux automatiquement à intervalle de temps fixe. Cela permet de faire plusieurs expériences en parallèle avec les avantages qu'il est possible d'avoir plus de répliques, de tester différentes conditions et d'utiliser le même inoculum. La macro déplace séquentiellement la platine afin qu'un microcanal soit dans le champ de vision du microscope, puis une image est acquise. Les images sont enregistrées automatiquement. Les coordonnées XY pour chaque région d'intérêt sont déterminées au préalable par l'utilisateur. Lorsqu'une image est acquise pour chaque canal, le logiciel attend une heure, puis le processus recommence jusqu'à ce que l'expérience soit terminée.

3.6.1 Analyse et traitement des images

Les micrographies sont analysées avec le logiciel ImageJ [102]. Chaque série d'images d'un même canal est regroupée. La dimension de l'image peut ensuite être calibrée à partir d'une référence. La première image est alors utilisée comme référence pour la soustraction d'image de fond et pour convertir les valeurs de pixel de l'image en densité optique (*O.D.*) selon l'équation 4-1.

$$O.D. = -\log I/I_0$$

Équation 3-1

où I est la valeur de pixel sur l'image de référence et I_0 est la valeur de pixel sur l'image à analyser. La division des deux images ainsi que le logarithme du résultat et la multiplication par -1 peuvent être faits directement dans le ImageJ. Par la suite, il faut faire subir une rotation à l'image pour que le microcanal soit aligné parallèlement aux bords de l'image. Cela simplifie le traitement des images puisque la mesure des valeurs de densité optique se fera dans une région d'intérêt rectangulaire alignée parallèlement avec l'image.

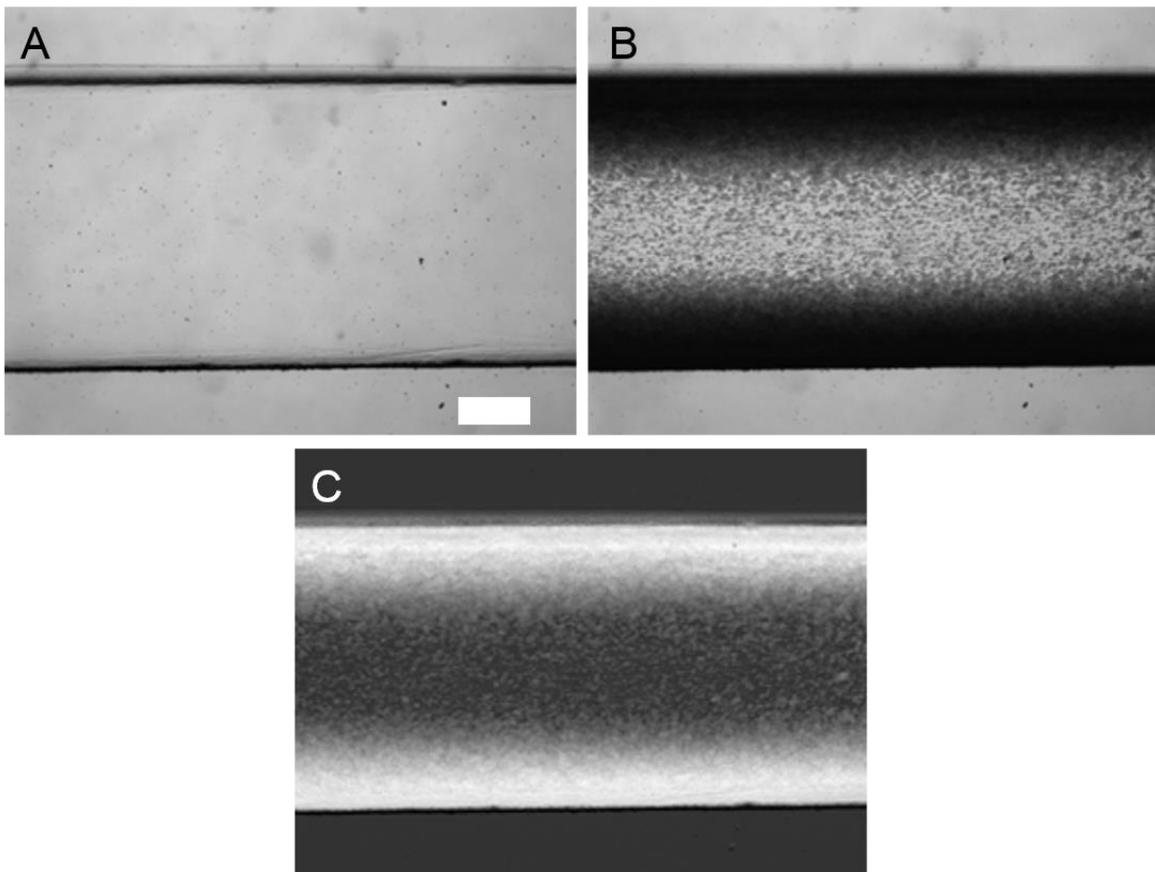


Figure 3-6 : Micrographie du microcanal A) avant l'inoculation et B) après 70 heures de croissance. C) Image de densité optique obtenue à partir de A) et B) avec l'équation 4-1. La barre d'échelle mesure 500 μ m.

La Figure 3-6 montre les micrographies d'un canal avant l'inoculation (A) et après 70 heures de croissance (B). La première image est utilisée en tant que référence puisqu'à ce moment le microcanal contient seulement la solution de nutriments. On peut voir les bords du microcanal ainsi que quelques imperfections et poussières en dehors du microcanal. De plus, le contraste est très faible dans les régions où il y a beaucoup d'accumulation de biomasse alors qu'il est plus élevé là où il y en a moins. Puisque les images sont acquises en transmission, les régions les plus claires sont celles où la lumière est moins absorbée. Après avoir fait la conversion en densité optique (Figure 3-6 C), les régions plus claires dans l'image sont celles où la lumière est plus absorbée ou diffusée. Le contraste est plus grand dans les zones avec une biomasse plus élevée (bords du microcanal) et reste bon dans le milieu du canal où il y a moins de biofilm.

On observe à la Figure 3-6 C que les imperfections et poussières qui étaient présentes en dehors du microcanal avant le traitement de l'image sont disparues. Cela permet de s'assurer que lors des mesures, le contraste provient uniquement du changement de biomasse et non du dispositif lui-même. Pour que cela soit vrai, il faut que le dispositif microfluidique soit toujours exactement au même endroit et que le profil d'intensité de la lumière soit constant. La platine motorisée permet de s'assurer du positionnement précis du dispositif pendant toute l'expérience. Dans le cas contraire, des objets dédoublés seraient observés dans l'image après la conversion avec l'image de référence. La lampe du microscope est branchée sur un bloc d'alimentation avec une batterie qui permet d'éliminer les légères fluctuations dans le réseau électrique du bâtiment. Ainsi lorsqu'on fait une mesure en dehors du microcanal, l'intensité reste constante durant toute l'expérience.

Les valeurs de densité optique moyennes ainsi que leurs écarts-types peuvent maintenant être mesurées sur différentes régions d'intérêt pour toutes les images. Afin de rendre les mesures plus efficaces, une macro ImageJ a été écrite. L'objectif est de faire des mesures répétées sur une région d'intérêt rectangulaire à partir d'un mur du microcanal jusqu'à l'autre. L'utilisateur doit d'abord définir la position initiale

et la taille de la région d'intérêt. La position XY, la longueur et la largeur de ce rectangle sont enregistrées. La valeur moyenne de densité optique et l'écart-type dans cette zone sont mesurées et consignées dans un tableau pour chaque point dans le temps. Lorsque cette partie est terminée, le rectangle définissant la région d'intérêt est déplacé par une distance équivalente à sa largeur pour que toutes les mesures soit faites sur des zones consécutives. Cette région peut être alors analysée et le processus est répété jusqu'à ce qu'à ce que le mur opposé du microcanal soit atteint.

À partir des mesures de densité optique, on peut mieux suivre la croissance du biofilm puisque la biomasse y est reliée [67, 68]. Il est important de considérer que deux principaux facteurs peuvent l'affecter. L'épaisseur du biofilm est généralement le plus important. Lorsqu'au cours de la croissance le biofilm devient plus épais, la distance que la lumière doit traverser devient plus grande, et donc, elle est plus diffusée. L'autre facteur à ne pas négliger est sa densité. Un biofilm contenant une grande concentration en bactéries ou une matrice extracellulaire très dense diffusera davantage la lumière. L'accumulation de molécules absorbant dans le domaine visible pourrait aussi contribuer à augmenter la densité optique observée sans qu'il y ait de changements d'épaisseur ou de densité. Cela ne s'applique pas pour les biofilms utilisés dans le cadre de ces travaux puisqu'ils ne produisent pas ou peu de ce type de composés. La moyenne de valeurs de densité optique (μ) peut être mesurée à l'intérieur d'une région d'intérêt. Pour ce faire, une boîte est tracée autour de l'endroit à analyser et la moyenne des valeurs de densité optique associées à chaque pixel de la région d'intérêt est déterminée à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ. L'écart type (σ) dans la région d'intérêt est aussi mesurée en même temps. À partir des valeurs μ et σ , on calcule le coefficient de variance (c_v ; Équation 4-2).

$$c_v = \frac{\sigma}{\mu} \quad \text{Équation 3-2}$$

Le coefficient de variance sert à évaluer la dispersion des valeurs de *O.D.* autour de la moyenne. Lorsque c_v est faible, les valeurs de *O.D.* sont rapprochées, donc on considère que le biofilm est homogène. Dans le cas où il est hétérogène, c_v sera élevé. Ce paramètre peut aussi être suivi dans le temps pour les différentes positions mesurées afin de mieux comprendre la croissance du biofilm.

3.7 SERS

3.7.1 Fabrication du dispositif

Pour les expériences SERS, un dispositif microfluidique à deux étages fait en PDMS, tel que montré à la Figure 3-7, a été choisi. Le premier étage a un canal court de dimensions 2 mm x 305 μ m x 32 mm (largeur x hauteur x longueur). Le second étage a des dimensions de 2 mm x 305 μ m x 9 mm (largeur x hauteur x longueur). Lors de la fabrication, les deux niveaux sont alignés et attachés ensemble pour qu'ils soient colinéaires et qu'il y ait un recouvrement entre les deux. Une jonction cylindrique est percée à partir d'un emporte-pièce conçu à cet effet. Le trou est formé à un angle de 45 degrés pour que le liquide entre dans le premier niveau avec une composante de sa vitesse dans la direction du canal. Cela permet de confiner l'écoulement de la solution le plus près possible du fond du canal, de réduire les forces de cisaillement entre les deux écoulements et de maintenir l'écoulement laminaire. Le dessus du microcanal est scellé avec une lamelle de microscope d'une épaisseur de 170 μ m, ce qui accommode la distance focale de l'objectif du spectromicroscope Raman. Il est d'ailleurs préférable de travailler avec des lamelles de verre d'une faible épaisseur pour les mesures Raman afin de ne pas nuire à la résolution de l'appareil. Les liquides utilisés pour le confinement (eau pure) et la solution d'analyte (solution de citrate de sodium) sont introduits par les entrées 1 et 2 à un débit Q_1 et Q_2 ,

respectivement. La Figure 3-7 C montre une coupe dans la section transversale du niveau 1 avec la lamelle de verre en haut et les trois murs recouverts d'une couche d'argent. Toutes les caractérisations sont faites sur la surface du fond du canal dans le niveau 1. Un dispositif complet est montré à la Figure 3-7 D. Une solution colorée en rouge représente la solution de confinement (eau pure) et une solution colorée en bleu représente la solution de citrate de sodium.

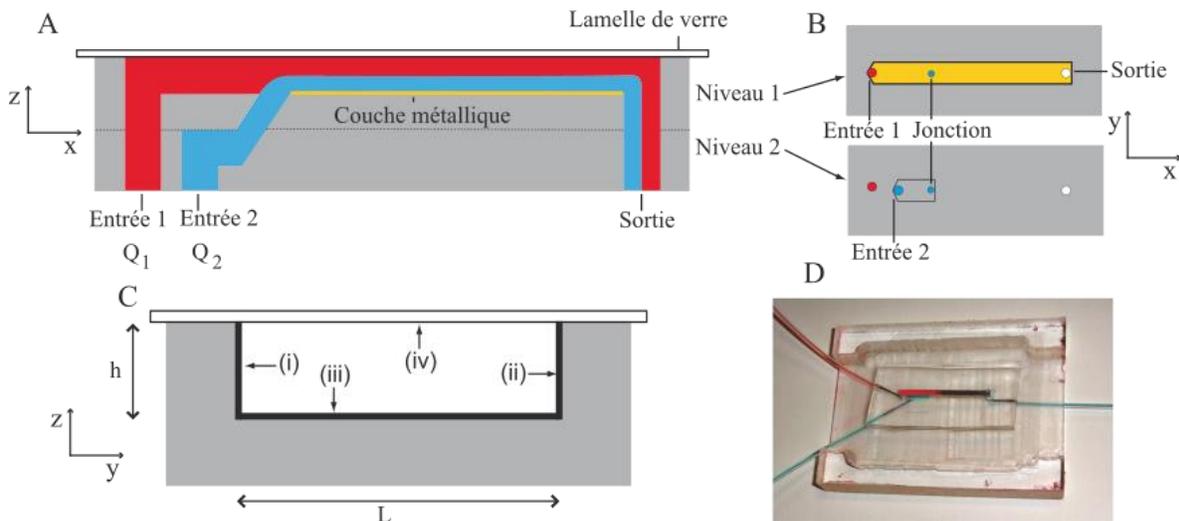


Figure 3-7 : Schéma représentant le dispositif à deux étages qui est utilisé pour les expériences SERS. A) Vue dans la section transversale du dispositif dans le plan XZ. L'entrée 1 est utilisée pour introduire la solution de confinement (eau) représentée en rouge à un débit Q_1 . L'entrée 2 est utilisée pour introduire la solution de citrate de sodium représentée en bleu à un débit Q_2 . La solution rouge confine la solution bleue au fond du microcanal. B) Vue des deux niveaux dans le plan XY. La jonction, les deux entrées et la sortie sont représentées par des cercles. C) Vue de la section transversale du canal principal (niveau 1) dans le plan YZ. Les murs du canal sont une pièce de PDMS (en gris) et sont couverts d'une couche métallique sur les murs de côtés (i, ii) et sur le fond du canal (iii). La couche métallique au fond du canal sert de surface SERS. Le quatrième mur est une lamelle de verre attachée au dispositif (iv). Le canal a les dimensions suivantes : $h = 305 \mu\text{m}$ et $l = 2 \text{ mm}$ (pas à l'échelle). D) Photographie du dispositif avec les tubes faisant circuler des solutions de colorant rouge et bleu aux entrées 1 et 2 respectivement. Le dispositif microfluidique est placé avec la lamelle de verre en haut afin de permettre l'accès pour les mesures en spectroscopie Raman (appareil équipé d'un microscope droit). Le support du dispositif permet d'avoir suffisamment d'espace pour connecter les tubes aux entrées et à la sortie à l'aide de joints coudés métalliques.

3.7.2 Préparation des surfaces pour les études SERS en microfluidique

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour former des surfaces actives pour le SERS. Dans le cadre de ces travaux, nous avons privilégié la méthode de déposition autocatalytique avec l'argent. Ce métal est connu comme étant très actif en plasmonique [105]. La déposition autocatalytique consiste à réduire un sel d'un métal en solution à l'aide d'un agent réducteur. Cette réaction est catalysée par la couche de métal qui est formée, par conséquent lorsque la réaction est amorcée, elle se produit rapidement.



Figure 3-8 : Réaction entre le réactif de Tollens avec un aldéhyde en milieu aqueux basique pour former un acétate d'ammonium et un précipité d'argent métallique.

Dans le cadre de ces travaux, la réaction de Tollens a été utilisée pour la déposition de la couche d'argent. Le réactif de Tollens a été préparé en mélangeant d'abord une solution d'hydroxyde de sodium avec une solution de nitrate d'argent, ce qui provoque la précipitation d'AgO₂. De l'hydroxyde d'ammonium est ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que l'oxyde d'argent soit complètement dissout. Cela permet de former le réactif de Tollens Ag(NH₃)₂OH. La solution de Tollens est ensuite mélangée à une solution d'acide L-tartrique et de glucose [106]. Lorsque le réactif de Tollens est mélangé avec un aldéhyde, la réaction décrite à la Figure 3-8 se produit. Dans ce composé, le potentiel de réduction de l'argent est fortement diminué et il peut réagir avec un aldéhyde afin de former de l'argent métallique et le carboxylate d'ammonium de l'aldéhyde de départ. Par ailleurs, cette réaction est communément utilisée afin de détecter la présence d'une fonctionnalité aldéhyde dans un composé chimique. Dans le cas présent, l'aldéhyde utilisé est le glucose. Ce composé est intéressant pour contrôler la réaction de Tollens puisque l'aldéhyde

du glucose est partiellement masqué lorsque la molécule est dans sa forme cyclique. Ceci, ainsi que l'addition d'acide L-tartrique, permet de ralentir la réaction. Cela permet de favoriser la formation de la couche d'argent sur la surface du microcanal par rapport à la formation de nanoparticules en solution. Le glucose qui a réagi pendant la réaction est converti en acide glucuronique.

La Figure 3-9 illustre les différentes étapes du processus de formation de la surface d'argent active en SERS. Ces étapes se font sur la pièce de PDMS avec le canal avant l'assemblage. Afin de faire la déposition uniquement dans le microcanal, les bords du dispositif sont protégés par du ruban adhésif. Le microcanal est ensuite soumis à un traitement plasma avant de faire la déposition d'argent afin que la surface soit plus hydrophile. La solution de déposition autocatalytique est alors déposée directement dans le microcanal. Cela favorise la formation d'une couche d'argent plus homogène dans le microcanal. La solution est ensuite retirée et le canal est rincé avec de l'eau ultrapure à plusieurs reprises puis séché sous un jet d'azote. La surface d'argent ainsi formée est exposée à un traitement plasma d'air afin d'augmenter l'effet SERS avec un appareil Plasma Cleaner (PCD-001, Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA) à une pression de 600 mTorr à une puissance de 29,6 W [107]. Les pièces de ruban adhésif placées pour protéger les côtés du microcanal sont finalement retirées et le dispositif final peut être assemblé.

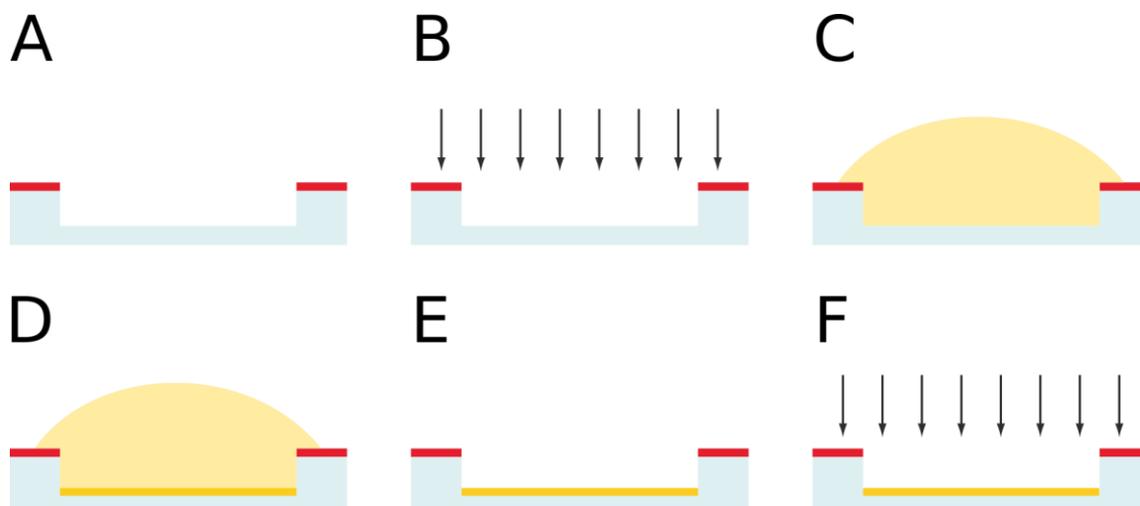


Figure 3-9 : Déposition de la surface d'argent par réduction autocatalytique. A) Protection des côtés du microcanal par du ruban adhésif (en rouge). B) Traitement plasma C) Remplissage du canal par la solution de déposition autocatalytique. D) Formation de la couche métallique. E) Rinçage du microcanal et séchage. F) Traitement plasma pour augmenter l'effet SERS.

3.7.3 Caractérisation des surfaces d'argent

Afin de mieux comprendre la structure de la couche métallique et de l'effet du traitement au plasma d'air, des mesures en microscopie à force atomique et en spectroscopie UV-VIS sont faites sur les surfaces préparées. La microscopie à force atomique (AFM, Nanoscope III multimode, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) a été utilisée afin de caractériser la topologie des surfaces d'argent. Les mesures ont été faites en mode *tapping* dans des conditions ambiantes. Un scanner de type J avec des pointes en silicium NSC15\AIBS (Mikromasch, Lady's Island, SC, USA) a été utilisé pour ces mesures. Chaque mesure a été faite sur une aire de $100 \mu\text{m}^2$ à 0.25 Hz avec un point de consigne entre 1.3 et 1.6 V, L'acquisition ainsi que les analyses de rugosité ont été faites avec le logiciel Nanoscope 5.30r3.

Les spectres UV-Vis en réflectance diffuse ont été acquis à partir d'un spectromètre Cary 500 Scan (Varian, Palo Alto, CA, USA) avec un accessoire pour la réflectance diffuse Praying Mantis™ (Harrick Scientific, Pleasantville, NY, USA). Une ligne de

base d'ordre zéro a été faite sur les spectres afin que les spectres aient la même valeur d'absorbance à 725 nm. Cette opération a été faite à l'aide du logiciel Grams/AI 8.0

3.7.4 Acquisition des spectres SERS

Les spectres Raman ont été acquis avec un spectromètre Raman LABRAM 800HR (Horiba Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) couplé avec un microscope Olympus BX avec un objectif 100x avec une longue focale (NA 0.75). La source d'excitation est un laser Ar⁺ (Coherent INOVA 70C Series Ion Laser, Santa Clara, CA, USA) utilisé à une longueur d'onde de 514,5 nm. Les mesures ont été faites avec une fente d'entrée de 200 µm et un trou confocal de 100 µm. Pour les mesures SERS, l'intensité du laser a été ajustée à 10 mW en utilisant un filtre neutre ayant une densité optique unitaire. Afin d'obtenir le spectre entre 300 et 4000 cm⁻¹, trois fenêtres spectrales ont été acquises puis juxtaposées par le logiciel du spectromètre. Les spectres Raman ont été traités et analysés à partir du logiciel Grams/AI 8.0 pour la correction de ligne de base et les mesures d'intensité. Afin de rendre plus simple la visualisation des spectres Raman acquis, une ligne de base multipoint linéaire a été appliquée pour chaque spectre. Les points utilisés ont été choisis pour qu'ils se retrouvent à des endroits exempts de bandes des composés analysés. Les mêmes paramètres sont utilisés pour la ligne de base de chacun des spectres. L'intensité de la bande νC-COO⁻ à 952 cm⁻¹ est déterminée à partir d'une ligne de base locale de chaque côté de la bande. Afin de faire une normalisation, cette intensité est divisée par l'intensité de la bande νO-H à 3535 cm⁻¹.

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.

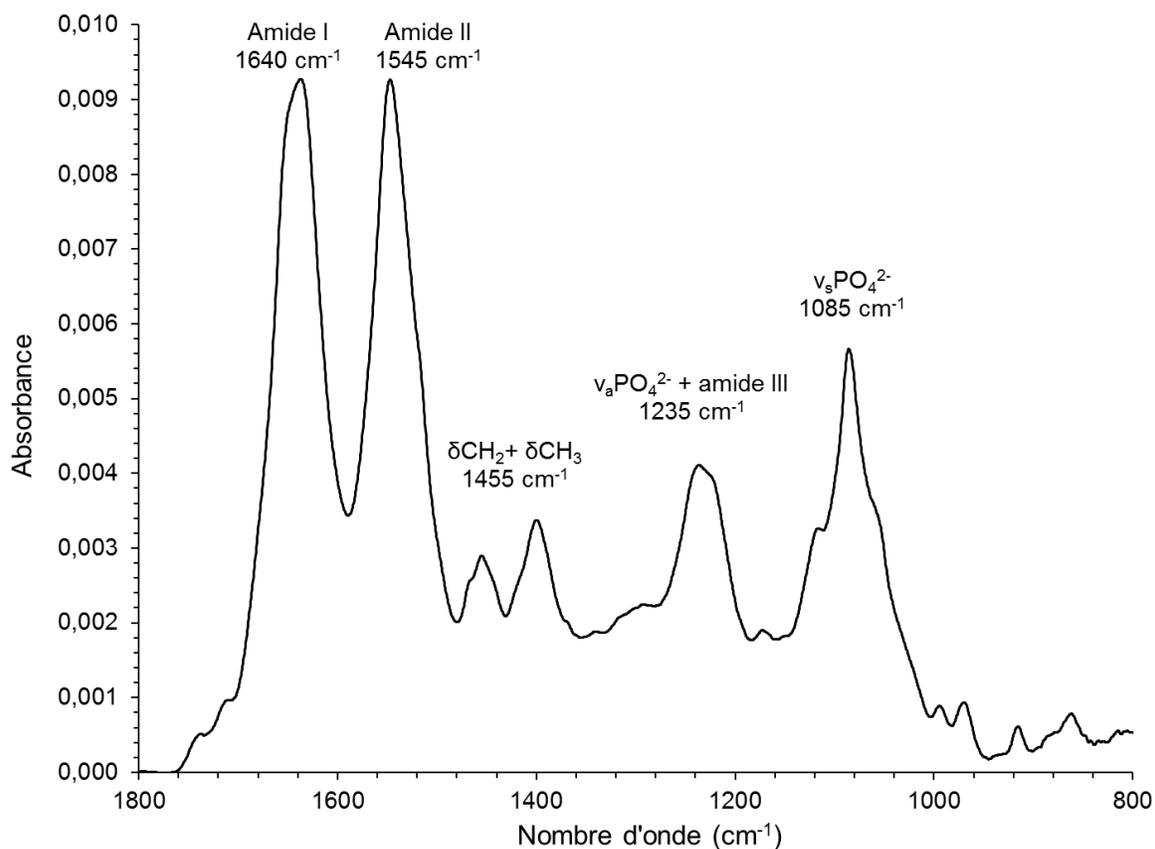


Figure 4-1 : Spectre infrarouge d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 sur le cristal ATR en diamant après 60 heures. Le spectre du milieu de culture (AB modifié avec 10 mM de citrate de sodium comme source de carbone) a été soustrait afin de mieux voir les bandes du biofilm.

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.

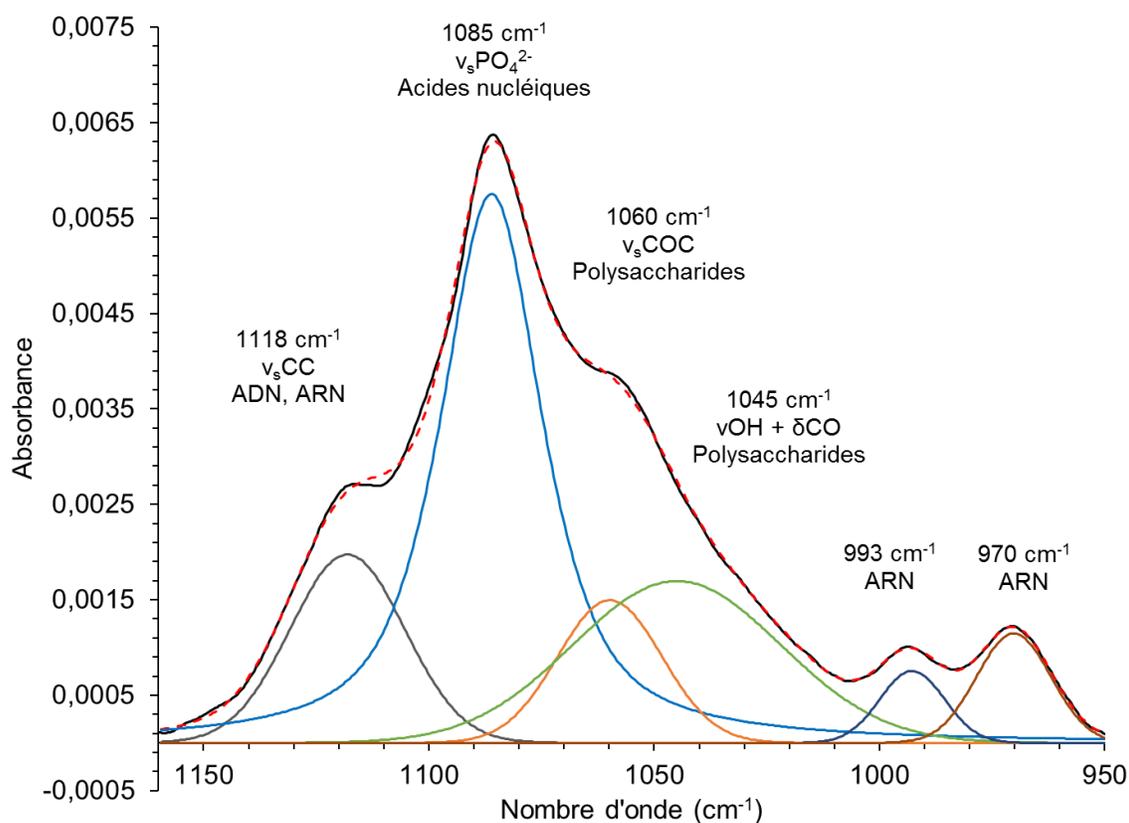


Figure 4-2 : Décomposition spectrale du spectre IR-ATR du biofilm montré à la Figure 4-1 entre 1160 et 950 cm^{-1} . Cette région comprend notamment la bande $\nu_s\text{CC}$ de l'ADN et ARN à 1118 cm^{-1} , la bande $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ à 1085 cm^{-1} des acides nucléiques et la bande $\nu_s\text{C-O-C}$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

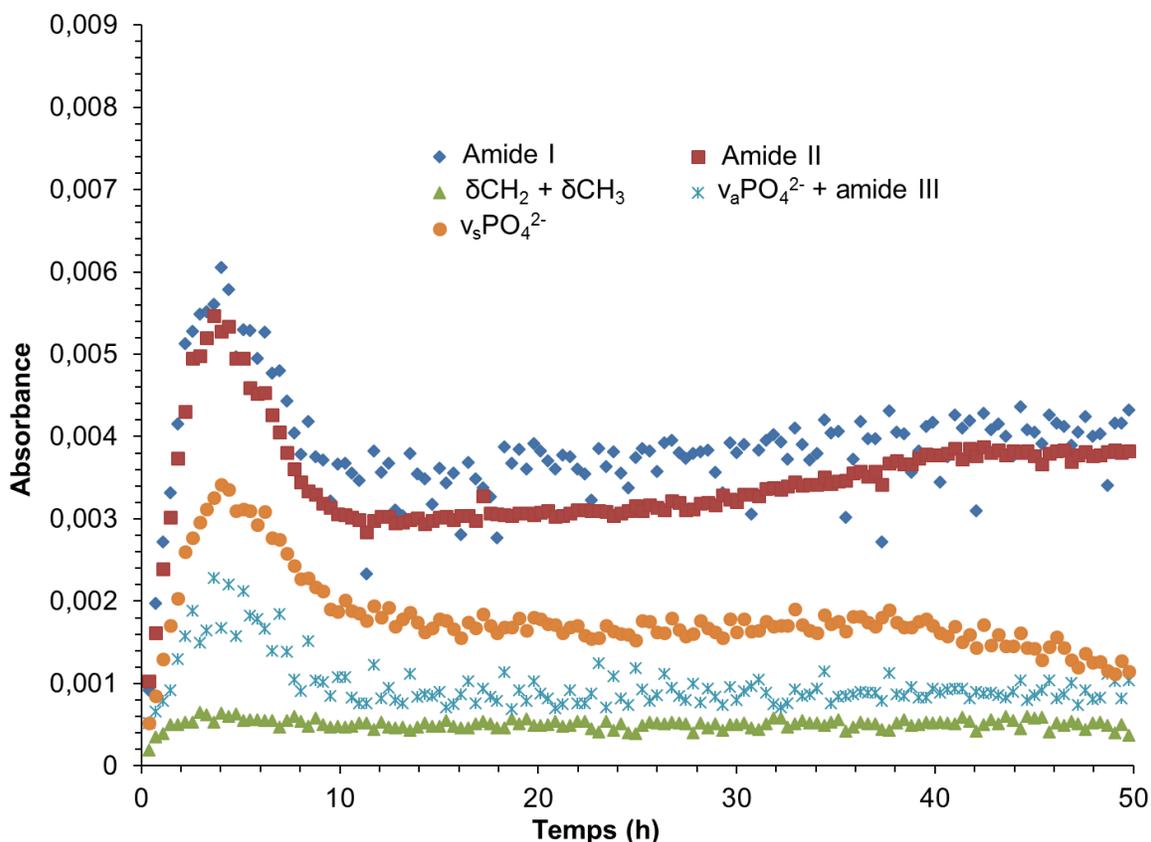


Figure 4-3 : Absorbance pour différentes bandes en spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée pendant la croissance d'un biofilm (amide I, amide II, $\delta\text{CH}_2 + \delta\text{CH}_3$, $\nu_a\text{PO}_4^{2-} + \text{amide III}$ et $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$ (losange bleu, carré rouge, triangle 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.

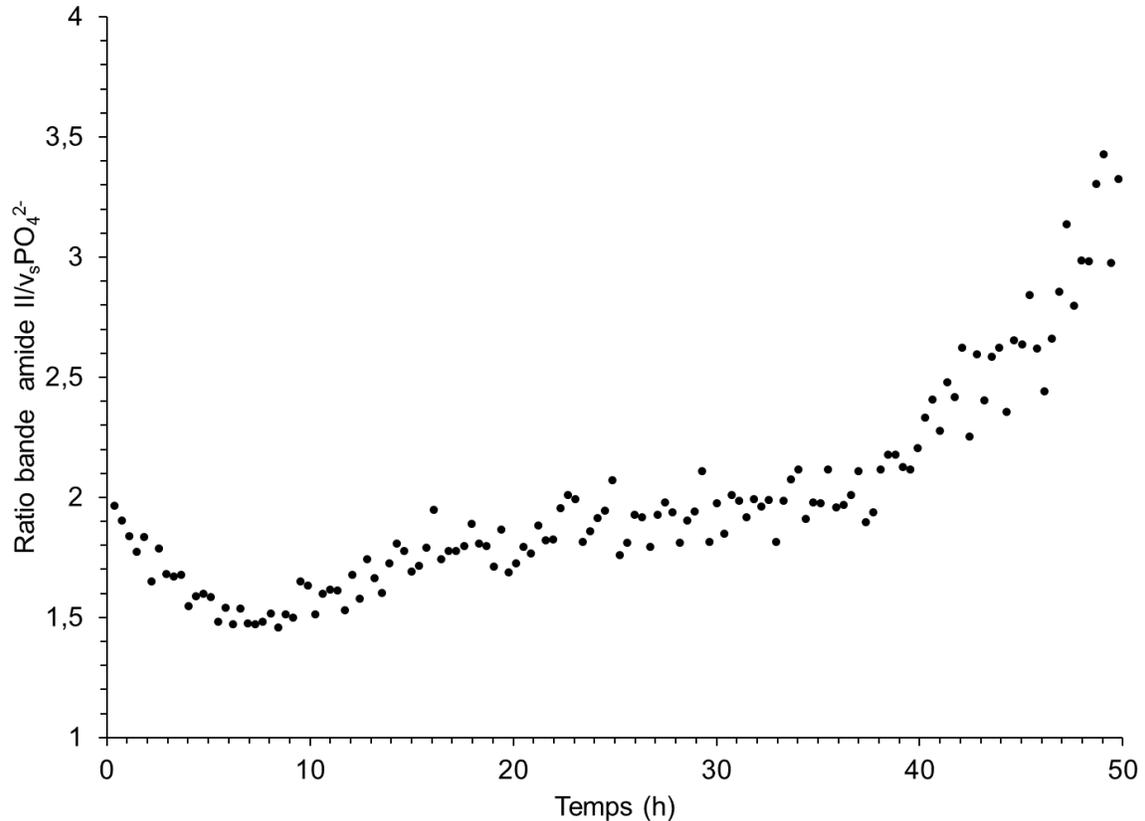


Figure 4-4 : Ratio entre la bande amide II et la bande $v_s\text{PO}_4^{2-}$ pendant la croissance du biofilm. La bande amide II est principalement associée aux protéines alors que la bande $v_s\text{PO}_4^{2-}$ est principalement reliée aux acides nucléiques.

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.

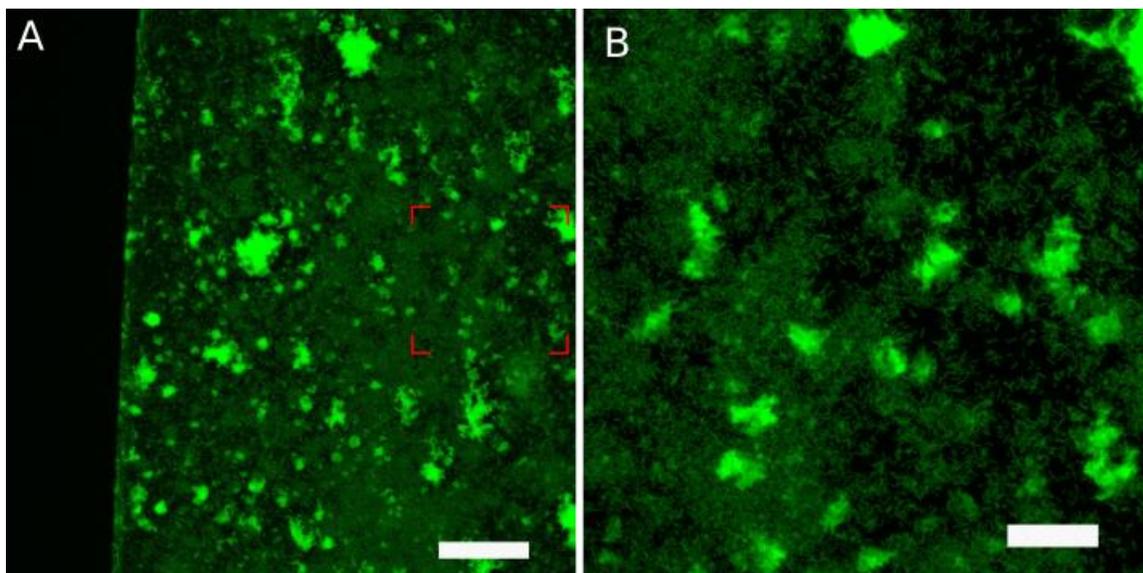


Figure 4-5 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 20 μm de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CTO7 après 70 heures de croissance pour l'objectif A) 10x et B) 40x. L'encadré en rouge dans A) indique la région mesurée pour B). Afin d'éviter de masquer la zone où les deux régions 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.

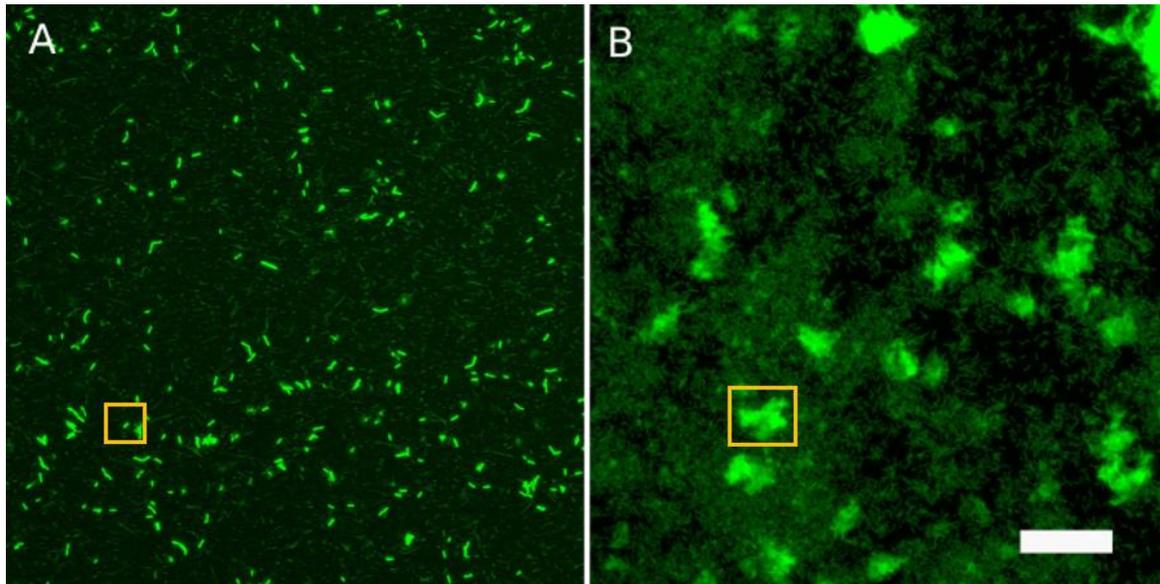


Figure 4-6 : Projection dans l'axe Z sur une profondeur de 18 μm de l'empilement confocal du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après 12 (A) et 70 (B) heures de croissance. Les images ont été acquises avec un objectif 60x à immersion. Les deux encadrés jaunes indiquent les régions qui seront analysées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

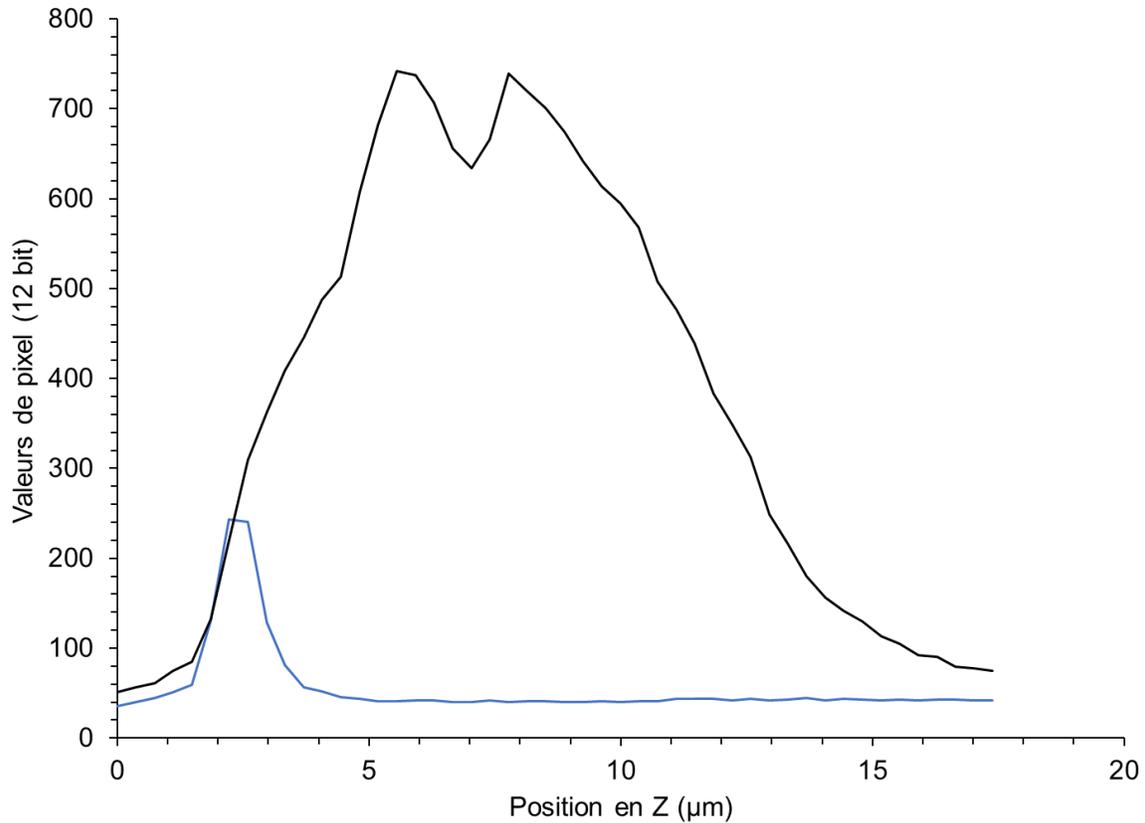


Figure 4-7 : Profil d'intensité (échelle 12 bit) dans l'axe Z pour les régions du biofilm montrées à la Figure 4-6. La courbe en bleu correspond à une microcolonie formée de quelques bactéries qui est représentative du système peu de temps après la période de croissance rapide (12 heures ; encadré jaune 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.

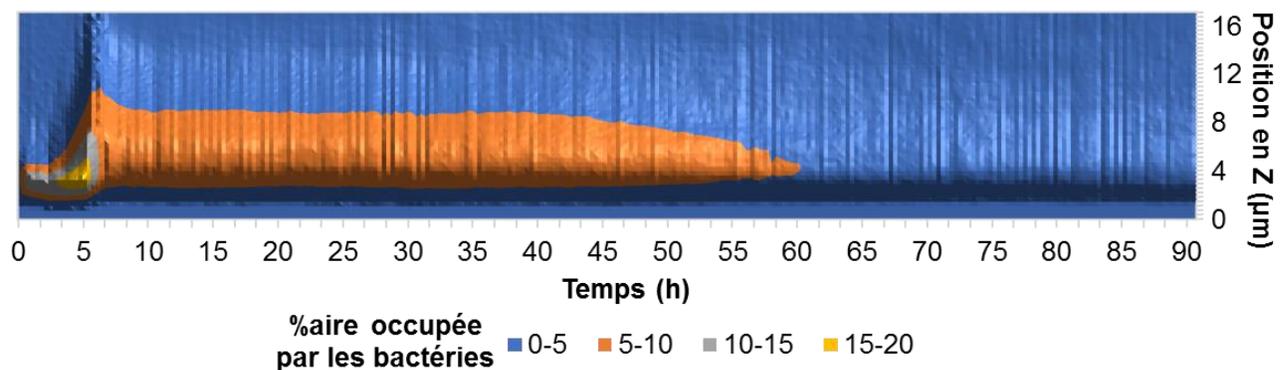


Figure 4-8 : Graphique de contour du pourcentage de l'aire occupée par les bactéries dans chaque plan XY pour chaque position en Z pendant la croissance déterminée à partir du traitement des empilement confocaux obtenue en microscopie confocale.

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.

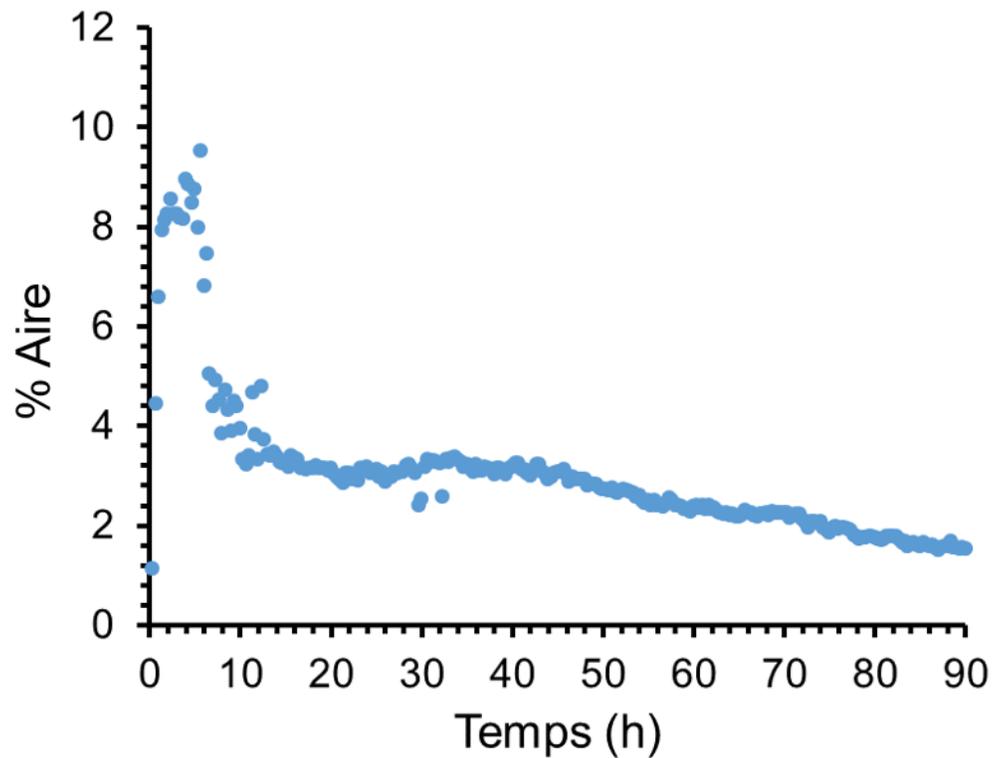


Figure 4-9 : Pourcentage de l'aire occupée par les bactéries entre 0 et 2 μm au-dessus de la surface de la lamelle de verre mesuré à partir de la microscopie confocale. Pour ces mesures, l'aire pour chaque tranche entre 0 et 2 μm dans l'empilement confocal a été mesurée et la moyenne pour chaque point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

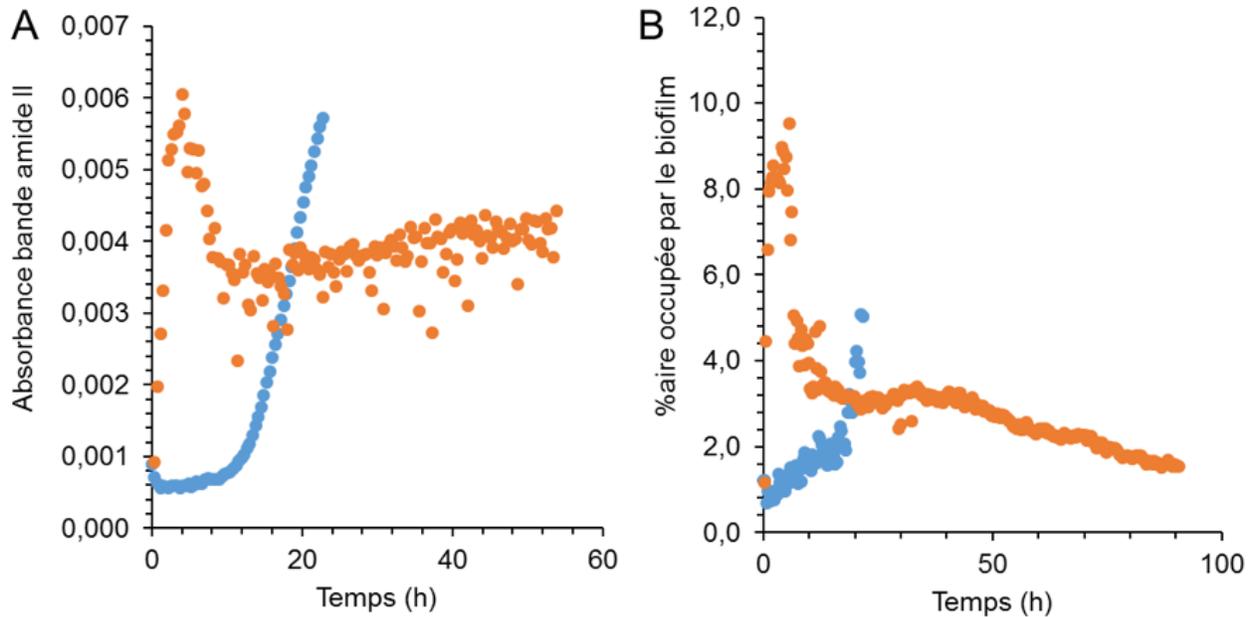


Figure 4-10 : Courbe de croissance obtenue par A) spectroscopie infrarouge et B) microscopie confocale pour des biofilms en inoculation directe (bleu) et indirecte (orange).

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.

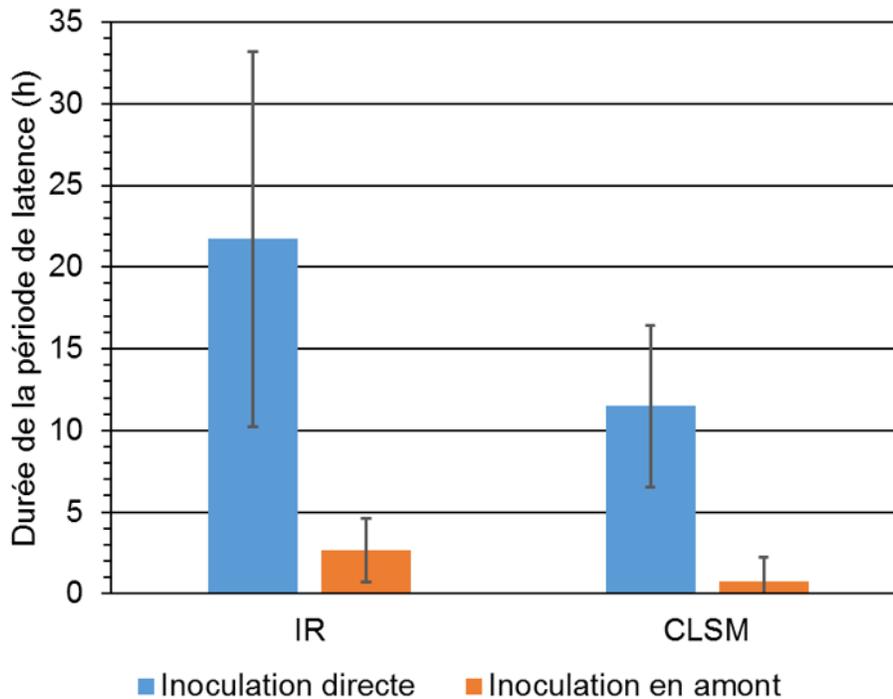


Figure 4-11 : Durée de la période de latence déterminée pour les mesures en spectroscopie infrarouge (IR) et microscopie confocale (CLSM) pour des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 inoculés par injection directe dans le canal et par un biofilm en amont (en bleu et orange, respectivement). Les mesures 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.

Chapitre 5 : Effet de la géométrie de la surface d'attache sur la croissance des biofilms

5.1 Introduction

La croissance des biofilms se produit majoritairement à partir des interfaces solide/liquide. La microfluidique est de plus en plus utilisée pour l'étude *in situ* des biofilms [55]. Cette technique est un outil efficace pour contrôler leur environnement chimique et physique. Dans un microcanal, la proportion entre l'aire des surfaces par rapport au volume est très grande en comparaison avec des canaux de plus grandes dimensions. Cet effet a un impact sur la croissance des biofilms. La Figure 5-1 représente la section transversale d'un microcanal d'une largeur l et hauteur h . Deux portions de cercles sont représentées afin de démontrer la différence de rapport aire/volume entre le centre et les coins d'un microcanal. Pour une partie de biofilm placée dans un coin, la surface d'un biofilm est moins exposée à l'écoulement qu'au milieu. L'écoulement laminaire dans le microcanal provoque la formation de forces de cisaillement qui peuvent être importantes à proximité des murs [59]. À la jonction de deux murs, une bactérie ou un biofilm sera affecté par l'effet combiné des deux surfaces. En plus d'avoir un impact sur les forces de cisaillement, la vitesse moyenne locale pour une particule à la jonction des deux murs sera plus faible que celle pour une particule au milieu du mur du fond du microcanal (identifiées respectivement par a et b à la Figure 5-1).

La présence d'une vitesse locale et de forces de cisaillement différentes peut avoir plusieurs effets sur la croissance des biofilms. Pour cette raison, il est important de bien comprendre leur impact pour apprendre davantage sur les biofilms. Il est couramment observé dans la littérature lors des étapes de maturation des biofilms que la croissance se fait à partir des murs de côtés du microcanal. Ce phénomène est observé pour plusieurs géométries de microcanaux, tel que les canaux droits et

en serpentin. Le type de canal, ses dimensions et le débit ont une influence sur la forme du biofilm et la vitesse à laquelle il se développe [59, 114]. Il semble que les forces de cisaillement puissent être impliquées dans ce phénomène. L'influence de deux murs dans les coins a un impact à la fois sur la taille de la surface sur laquelle les bactéries peuvent s'attacher et sur les forces de cisaillement. Il est aussi possible que la présence combinée d'une surface de PDMS (mur de côté) et de verre (fond du canal) ait un effet. La première partie de ce chapitre se concentre globalement sur la croissance préférentielle à partir des murs de côté pour un canal rectangulaire. L'effet de la hauteur du microcanal, et par extension du ratio d'aspect du microcanal, sera évalué. La seconde partie de ce chapitre porte plus spécifiquement sur la croissance du biofilm dans le coin du microcanal afin de mieux comprendre l'impact local des deux murs.

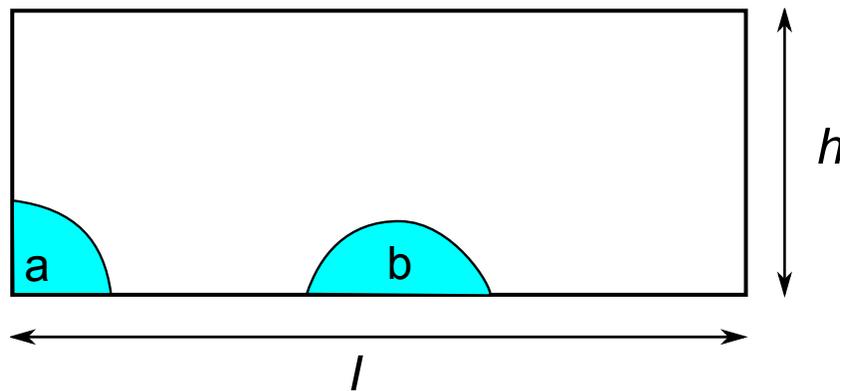


Figure 5-1 : Schéma représentant la section transversale d'un microcanal avec une portion de biofilm au coin (a) et au milieu d'un canal d'une largeur l et hauteur h .

5.2 Effet de la hauteur du microcanal sur la croissance à partir des côtés étudié par microscopie en champ clair

Les forces de cisaillement ainsi que la vitesse du flux sont déterminantes pour les différentes étapes de croissance. Afin de conserver les forces de cisaillement constantes, deux microcanaux de hauteurs différentes ont été utilisés et les débits ont été ajustés. Les forces de cisaillement ont un impact important sur la croissance des biofilms puisqu'ils en provoquent l'érosion [8]. Les microcanaux ont la même longueur et la même largeur, mais ils ont une hauteur différente. Ils mesurent respectivement 88 et 145 μm de haut et leur largeur est de 2000 μm . L'équation 3-5 a été utilisée afin de calculer le débit pour lequel les forces de cisaillement sont identiques et l'équation 3-4 permet de calculer la vitesse moyenne dans ces deux canaux. Le Tableau 5-1 présente les vitesses moyennes et les forces de cisaillement moyennes pour les deux dispositifs ainsi que les débits appliqués. Afin que les forces de cisaillement moyennes soient identiques dans les deux microcanaux, un débit 2,7 fois plus élevé pour le dispositif d'une hauteur de 145 μm a été utilisé. Dans cette situation, la vitesse moyenne est 1,65 fois plus élevée pour ce canal.

Tableau 5-1 : Vitesse moyenne (v_m), force de cisaillement moyenne (τ_m) pour les canaux deux dispositifs utilisés et les débits du milieu de culture.

Hauteur (μm)	Débit (mL/h)	v_m (mm/s)	τ_m (N/m ²)
88	0,35	33,14	2,16
145	0,95	54,6	2,16

Les mesures de microscopie en champ clair sont optimisées afin de faire plusieurs mesures sur différents canaux en parallèle. Ainsi pour chaque expérience, il est possible de faire des mesures sur quatre microcanaux en même temps. Cela permet de faire simultanément deux répliques pour chaque hauteur de microcanal utilisé. Les mesures en parallèle comportent deux avantages importants. Le premier est qu'en faisant les mesures en parallèle, il est possible de s'assurer que les mesures soient faites exactement dans les mêmes conditions puisqu'on peut utiliser la même solution de bactéries pour l'inoculation. Ce faisant, on élimine ce facteur d'incertitude dans les mesures. Le second est que cela permet de réduire le temps total pour faire les différents répliques et d'optimiser l'utilisation du microscope. Tel que décrit dans la section expérimentale (Chapitre 3), l'acquisition des micrographies est automatisée et une platine motorisée permet le positionnement précis de chaque microcanal sous le microscope. De cette manière, chaque micrographie pour un même canal est prise au même endroit que la précédente facilitant ainsi le traitement des données. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de procéder à l'alignement des micrographies lors du traitement de données. Afin de pouvoir faire des mesures quantitatives et de convertir les micrographies pour déterminer la densité optique pour chaque pixel, il faut procéder à la soustraction d'une image de référence.

La Figure 5-2 montre les images de densité optique d'un biofilm pendant la croissance dans un microcanal d'une hauteur de 88 μm . Pour ces mesures, les biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 ont été inoculés de manière directe tel que décrit dans la section expérimentale. Au début de l'expérience aucun biofilm n'est observé, puis après 45 heures, une faible biomasse commence à apparaître sur les deux côtés du microcanal. Il y a augmentation rapide du contraste à cet endroit et propagation vers le centre du canal. Après 70 heures, le biofilm est uniforme et a une densité optique élevée sur les côtés du microcanal. Il est hétérogène et de faible biomasse au centre du microcanal. Les microcolonies qui y sont observées sont indépendantes les unes des autres et leur taille est de l'ordre de la dizaine de microns. Ces résultats correspondent bien aux structures observées pour les biofilms dans un milieu AB (voir chapitre 6) et dans un milieu de culture minimal

[104]. Deux lignes noires sont observées là où se trouvent les murs du microcanal. À cet endroit, la présence de ces structures élevées provoque la formation d'une ombre qui masque partiellement les bords du microcanal. Sur une région d'environ 20 μm à partir du bord du microcanal, cette ombre a un impact sur les mesures de densité optique et les rend plus imprécises ce qui pourrait affecter les résultats et conclusion qui en sont tirés. Toutes les données prises à partir de ces images sont faites à partir de 40 μm du mur du microcanal afin d'éviter cet effet. De plus, les micrographies en microscopie en champ clair représentent la densité optique dans toute la hauteur du microcanal. Les biofilms doivent être attachés à une surface pour croître. Les résultats obtenus proviennent donc à la fois des parties de biofilm attachées au mur du fond et du mur du haut du microcanal.

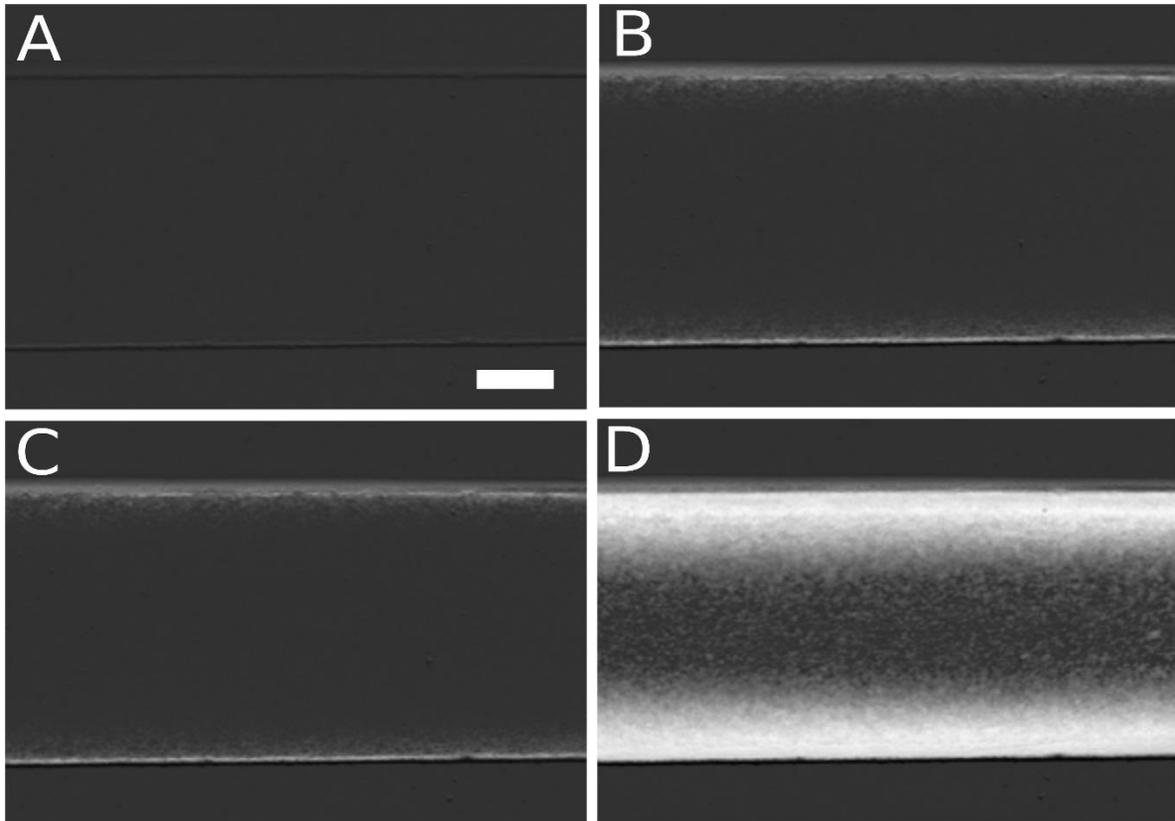


Figure 5-2 : Images de densité optique obtenues à partir de mesures en microscopie en champ clair d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après croissance dans un microcanal d'une profondeur de 88 μm pendant A) 15, B) 45, C) 55 et D) 70 heures. Un milieu de culture AB modifié est utilisé et l'écoulement se fait de la gauche vers la droite dans le microcanal. La barre d'échelle en A) mesure 500 μm et est représentative pour toutes les images.

Afin de mieux suivre la croissance, la densité optique a été mesurée à chaque intervalle de 20 μm dans la section transversale du microcanal. La Figure 5-3 montre les résultats pour le microcanal d'une hauteur de 88 μm à différentes distances du mur. À proximité du mur (40 μm), la densité optique est constante et près de zéro jusqu'à environ 40 heures, ce qui correspond à la période de latence du biofilm. Entre 40 et 60 heures, la densité optique augmente jusqu'à 2,75. Cette partie correspond à la période de croissance rapide. Par la suite, la densité optique demeure élevée et relativement constante jusqu'à la fin de la période d'observation. À des distances plus grandes du mur de côté, la période de latence

est plus longue. Par exemple, à une distance de 200 μm , elle est d'environ 45 heures. La pente de la région de croissance rapide est aussi plus faible. Au centre du microcanal la période de latence est de 60 heures et la pente de la phase de croissance rapide est très faible. Pour les distances intermédiaires, la transition se fait graduellement.

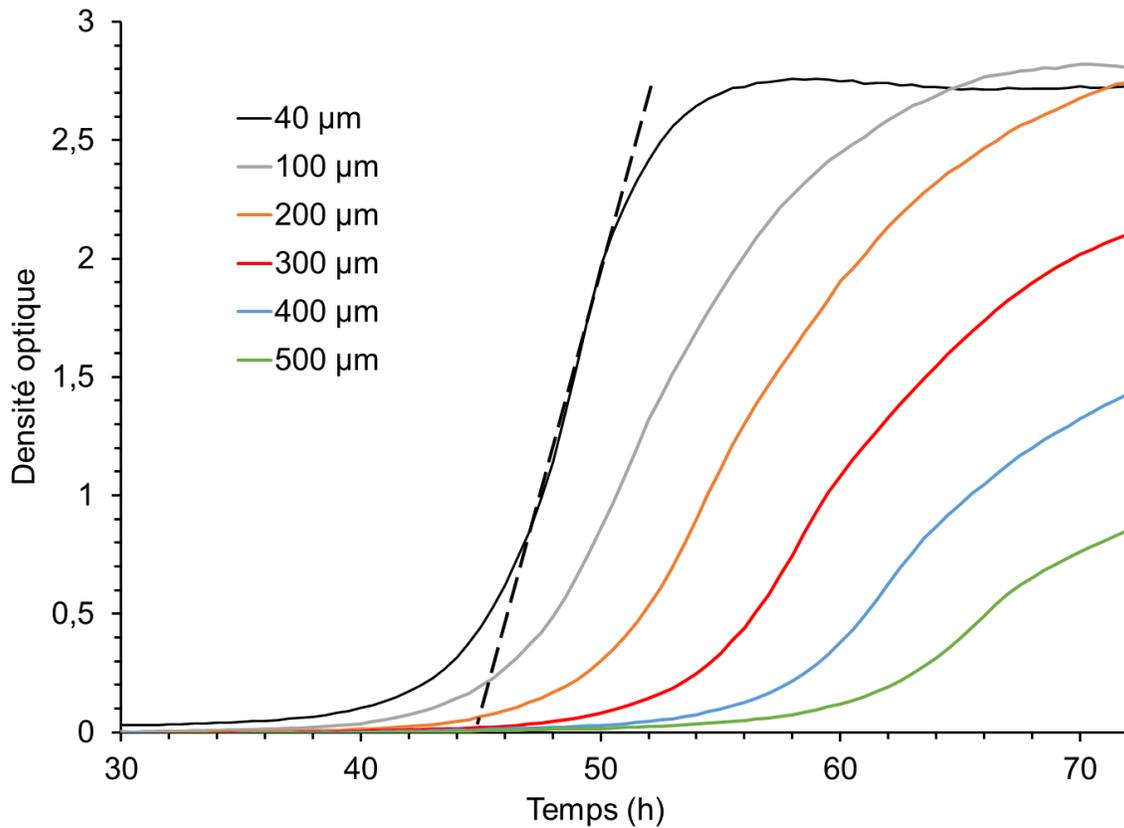


Figure 5-3 : Courbe de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 40, 100, 200, 300, 400 et 500 μm du mur du microcanal d'une hauteur de 88 μm (respectivement en noir, gris, orange, rouge, bleu et vert). Les courbes de croissance sont générées à partir de la densité optique obtenue après le traitement des images en microscopie en champ clair. La ligne pointillée pour la courbe noire montre la région utilisée pour les mesures de taux de croissance dans la phase de croissance rapide du biofilm.

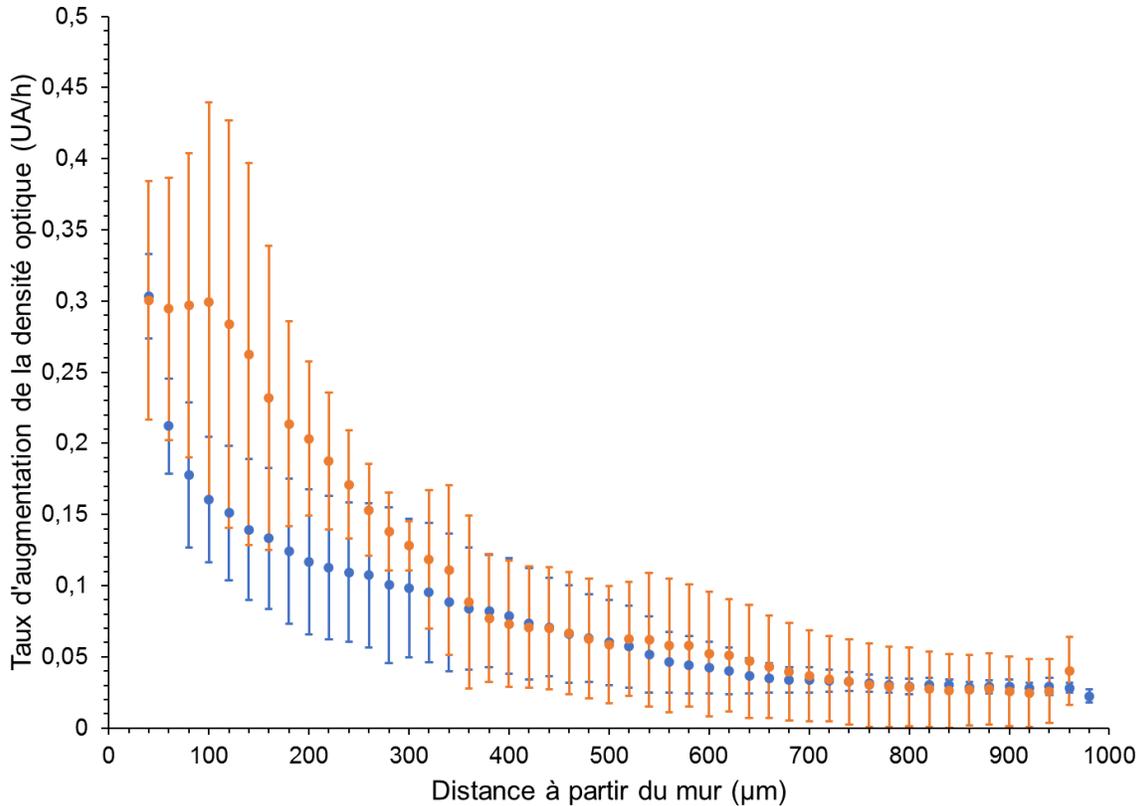


Figure 5-4 : Taux d'augmentation de la densité optique dans la phase de croissance rapide du biofilm pour différentes distances à partir du mur du microcanal. Les données pour des canaux de 88 et 145 µm sont représentées respectivement en bleu et orange. Les résultats pour les deux mesures correspondent à la moyenne de trois réplicas et les barres d'erreur à leur écart type.

Le taux de croissance des biofilms a été mesuré dans la phase de croissance rapide. Le biofilm au centre n'atteint pas de phase stationnaire, donc il n'est possible de mesurer le temps de doublement. Pour ce faire, une droite a été ajustée sur cette section de la courbe de densité optique en fonction du temps tel qu'illustré par la ligne pointillée à la Figure 5-3. Cette opération fut répétée pour chaque courbe de densité optique pour les deux dispositifs. Les taux d'augmentation de la densité optique dans la phase de croissance rapide pour les deux dispositifs se trouvent à la Figure 5-4. Ce graphique a été généré en calculant la moyenne de trois différentes séries de données acquises dans les mêmes conditions pour les deux dispositifs et

les barres d'erreur correspondent à l'écart type sur ces mesures. Dans les deux cas, la croissance est plus rapide à proximité des murs. La zone où la croissance est la plus rapide est aussi plus large pour le canal de hauteur plus grande. À partir d'environ 360 μm du mur, le taux d'augmentation de la densité optique est le même dans les deux cas. L'écart type sur les mesures est aussi plus élevé à proximité du mur, ce qui indique une plus grande variabilité dans le taux de croissance à cet endroit comparativement à celui mesuré au centre du microcanal. Dans le cadre de ces expériences, le débit a été ajusté afin que les forces de cisaillement soient constantes. D'après l'équation 2-4, lorsque l'on augmente la hauteur du microcanal de 1,64 fois, comme dans le cas présent, il faut augmenter le débit d'un facteur 2,72 pour compenser.

Il y a un gradient de vitesse entre les murs et le centre d'un milieu d'un microcanal. Cela provoque un cisaillement entre les différentes couches de l'écoulement laminaire et entre l'écoulement et une surface qui s'y trouve. Les forces de cisaillement sont plus importantes sur les murs et diminuent graduellement lorsqu'on se rapproche du centre du microcanal (Figure 2-1). Un cas particulier est observé pour les forces de cisaillement directement au-dessus d'un mur. Elles sont maximales au milieu de ce mur et diminuent jusqu'à être nulles lorsque les deux murs se rejoignent, donc au coin [8]. Cela peut donc favoriser la croissance initiale dans le coin puisque c'est à cet endroit que les forces de cisaillement sont les plus faibles dans le canal. Pour ce qui est du taux de croissance plus élevé pour le canal plus haut, cela pourrait s'expliquer par une quantité de nutriments plus importante. En effet, à un débit plus élevé, la solution nutritive (milieu de culture) est renouvelée plus rapidement et le flux moléculaire dans le biofilm est plus grand. Par conséquent, il y a plus de nutriments disponibles pour les bactéries et le biofilm. De plus, l'élimination des déchets est favorisée. D'un autre côté, puisque les forces de cisaillement sont les mêmes, l'érosion du biofilm devrait être similaire pour les deux microcanaux [8]. C'est principalement cette force qui peut provoquer le détachement des bactéries ou de parties du biofilm dans des conditions d'écoulement laminaire. Il a déjà été rapporté que pour des microcanaux de mêmes dimensions, une

augmentation du débit diminue significativement le taux de croissance et peut même empêcher la formation d'un biofilm stable. Un débit trop important pourrait nuire à, voire même interrompre, la communication entre des cellules dans la direction opposée à l'écoulement [115]. Il a aussi été observé dans d'autres travaux que l'apport de nutriments est un facteur plus déterminant que les forces de cisaillement pour la croissance des biofilms [59].

Si on considère le biofilm comme étant complètement homogène et lisse, une augmentation du débit, lorsqu'il est déjà suffisamment élevé, devrait avoir un impact relativement faible sur l'apport de nutriments. Le mélange dans un écoulement laminaire se fait seulement par diffusion contrairement aux écoulements turbulents où il y a convection. Le facteur limitant est donc la vitesse de diffusion à travers le biofilm qui est lente et dépend de sa forme, de sa densité et de sa composition [59]. Il est important de considérer que les biofilms ont tendance à former différentes structures favorisant la circulation de liquide au sein du biofilm afin de contrer la barrière de diffusion et éviter la formation de gradients de concentration trop élevés [9]. Par exemple, les structures en forme de champignon ont une base plus étroite que la partie du haut ce qui favorise l'écoulement entre les différentes parties du biofilm et rend les nutriments plus disponibles pour les bactéries qui sont à l'intérieur [116].

Les micrographies du biofilm à la Figure 5-2 permettent de voir qu'il forme des petites structures (de taille autour de 10 μm) au centre et des structures plus hautes et homogènes sur les côtés. La microscopie en champ clair avec un objectif à faible magnification ne permet pas de les caractériser précisément puisque la résolution et le contraste sont trop faibles. Puisque cette technique est basée sur la transmission de la lumière, il n'est pas possible la base du biofilm des parties supérieures. La microscopie confocale est un bon moyen pour mieux comprendre la croissance du biofilm à partir des côtés.

5.3 Accumulation préférentielle dans les coins

Dans la section précédente, il a été noté que les biofilms se développent plus rapidement sur les côtés du microcanal qu'au centre. La forme du microcanal, plus particulièrement la hauteur, a aussi un impact sur les résultats observés. Les biofilms sont connus pour être capable de croître dans des formes complexes afin de s'adapter à leur environnement hydrodynamique. La microscopie en champ clair ne permet pas d'avoir le contraste et la résolution nécessaires pour bien décrire ces phénomènes. La microscopie confocale à balayage laser a été utilisée puisque la résolution est plus grande et le contraste est plus élevé. La microscopie en champ clair permet de mesurer la densité optique à différents endroits du plan XY du microcanal, mais ne donne aucune information sur la distribution dans l'axe Z. La densité optique mesurée résulte en effet de l'absorption et de la diffusion de toutes les sections de biofilm dans cet axe. La microscopie confocale permet de résoudre les différents plans dans cet axe en plus d'augmenter la résolution dans le plan XY. Cette technique permettra donc d'étudier plus spécifiquement les effets se produisant directement dans les coins. La profondeur totale analysée pour ces expériences est de 13 μm et la résolution est de 0,37 μm . La résolution en Z permettra d'aller chercher de l'information directement au fond du microcanal et de voir s'il y a des différences entre les couches du biofilm. Les mesures prises à différents temps pendant la croissance seront utiles pour voir l'évolution du biofilm.

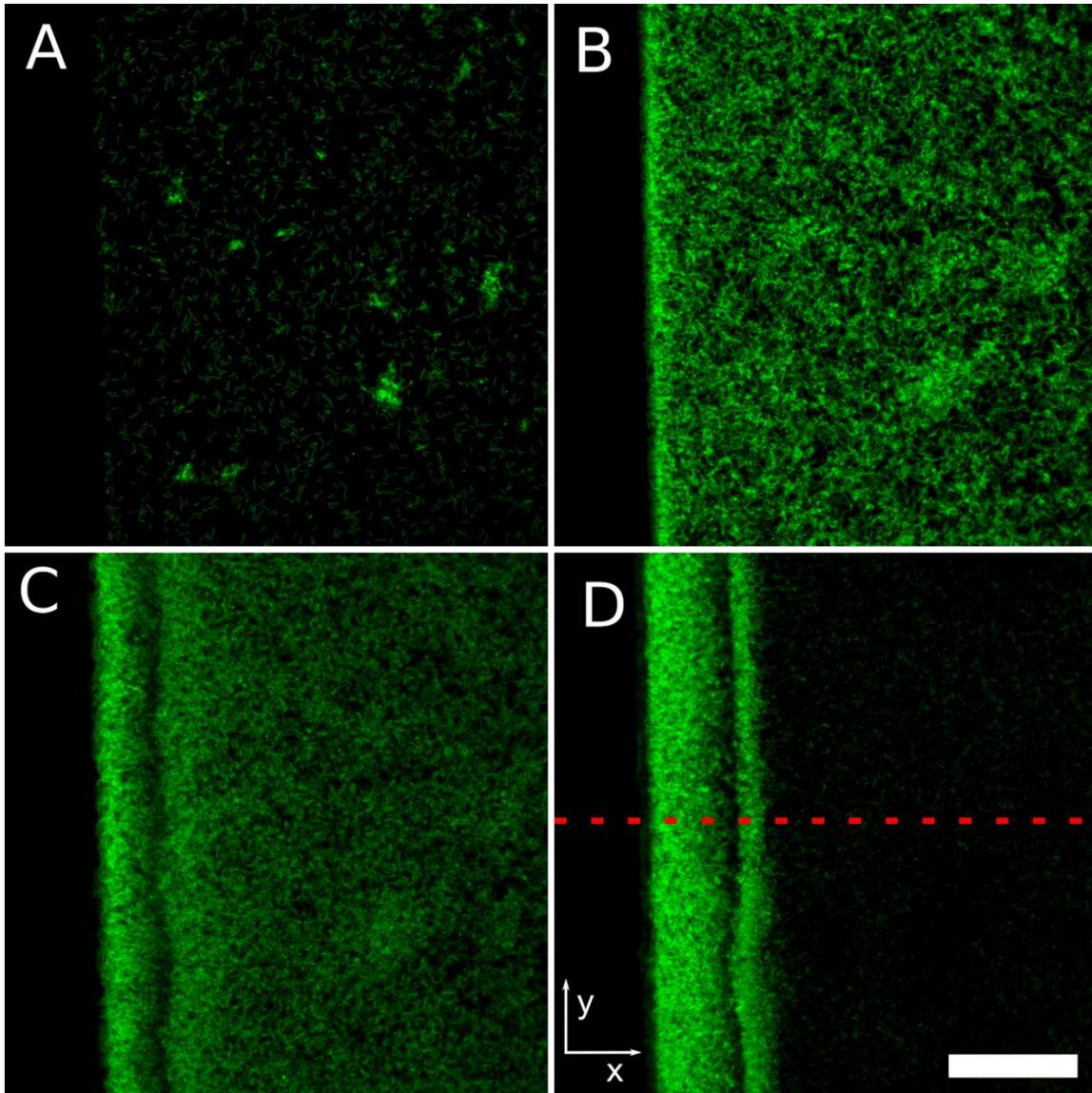


Figure 5-5 : Projection dans l'axe Z d'un empilement confocal après 1, 6, 16 et 50 heures de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 dans un milieu de culture AB modifié (A, B, C et D respectivement). Le microcanal utilisé mesure 305 x 2000 μm . Les mesures de microscopie confocale sont réalisées sur une profondeur de 13 μm . Les axes X et Y sont identifiés en D et correspondent respectivement à la largeur du canal et la longueur. L'écoulement du milieu de culture dans le microcanal se fait du bas vers le haut de l'image. La ligne pointillée en D montre la section qui a été utilisée pour générer la tranche dans le plan XT à la Figure 5-8. La barre d'échelle en D mesure 50 μm et est représentative pour les autres images.

La Figure 5-5 présente la variation de l'intensité selon l'axe X (section transversale du microcanal) pour différents points dans le temps. Cette figure a été générée en utilisant des projections dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 produit dans un microcanal. Lors des expériences en microscopie confocale, certaines structures ont été observées sur les côtés des microcanaux. La présence plus importante de biofilm sur le côté du microcanal est un des effets les plus marqués. Pour le reste du biofilm, on observe une épaisseur plus faible, mais plus uniforme. Dans les premières 12 heures, la croissance est relativement homogène au travers du canal avec un peu plus de biomasse directement à côté du mur latéral. Tel qu'observé à la Figure 5-5 A, une heure après l'inoculation, des bactéries plutôt isolées et répandues uniformément se retrouvent sur la surface du canal. Il y a aussi présence de quelques petites colonies. En général, il y a beaucoup d'espace entre les bactéries. Six heures après l'inoculation, beaucoup plus de bactéries se retrouvent au fond du microcanal (Figure 5-5 B). Il y a aussi une densification et plus de colonies sont observées. La répartition des bactéries est uniforme, bien qu'il y ait quelques zones plus denses. À partir de 13 heures, l'accumulation de biofilm devient plus prononcée sur le côté et on commence à voir une zone où il y a une diminution marquée de la biomasse qui s'observe par une ligne à environ 30 µm du coin du microcanal. Cela peut être vu de manière plus prononcée 16 heures après l'inoculation (Figure 5-5 C). À partir de ce moment, ce comportement continue pendant toute la durée de l'expérience. La Figure 5-5 D montre le même biofilm après 50 heures. Le contraste entre le biofilm au coin et dans le reste du canal est plus marqué. La ligne où la biomasse est faible est plus prononcée et est observée à une distance plus grande du mur de côté. La position de la ligne s'éloigne progressivement du mur pendant la croissance et devient plus perceptible. Les observations faites sur le biofilm présenté à la Figure 5-5 ont aussi été faites sur d'autres biofilms pendant des expériences différentes réalisées dans les mêmes conditions. La formation d'une zone ayant une biomasse faible est particulièrement intéressante. Cette ligne n'est observée qu'au fond du

microcanal. Lorsque l'on s'éloigne de la surface de la lamelle de verre, la largeur de cette zone vide rétrécit.

La vitesse de croissance du biofilm a été évaluée par microscopie confocale à différentes distances du mur de côté du microcanal (Figure 5-6). Pour ces mesures, l'intensité moyenne sur la projection dans l'axe Z (Figure 5-5) sur un intervalle de 5 μm à chaque 25 μm du mur de côté a été calculée. Pour toute la région observée, le maximum d'intensité observé est à 8 heures et les valeurs d'intensité moyenne sont comparables. Cela indique que le biofilm est plutôt homogène au début de sa croissance. La biomasse diminue ensuite ce qui s'observe par une diminution de l'intensité entre 8 et 10 heures. Par la suite, à proximité du mur de côté (25 μm), il y a une augmentation de l'intensité sur une courte période de 10 à 12 heures, puis de 32 à 42 heures. Dans les deux cas, ces augmentations sont suivies d'une diminution d'intensité. À 50 μm du mur de côté il y a une augmentation lente de l'intensité entre 10 et 24 heures qui est suivie par une diminution. La situation est similaire pour les positions plus éloignées à l'exception que l'augmentation de l'intensité est moins prononcée. Cela permet d'affirmer que lorsqu'on s'éloigne du mur de côté, après une augmentation initiale, la biomasse reste relativement constante avant de diminuer de manière importante.

Les mesures en transmission ont montré une augmentation constante de la biomasse (Figure 5-2). La différence entre les deux résultats en microscopie en champ clair et en microscopie confocale sont liés aux champs de vision observés des deux techniques. En microscopie en champ clair, les mesures sont faites en transmission et représentent donc la biomasse dans toute la hauteur du microcanal. En microscopie confocale, les mesures ont été faites sur une profondeur de 13 μm . Elles sont donc représentatives du biofilm seulement au fond du canal. L'augmentation initiale de la biomasse suivie d'une diminution serait donc attribuable à une restructuration du biofilm. Cet effet avait précédemment été observée et caractérisé par microscopie confocale et spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée au Chapitre 4.

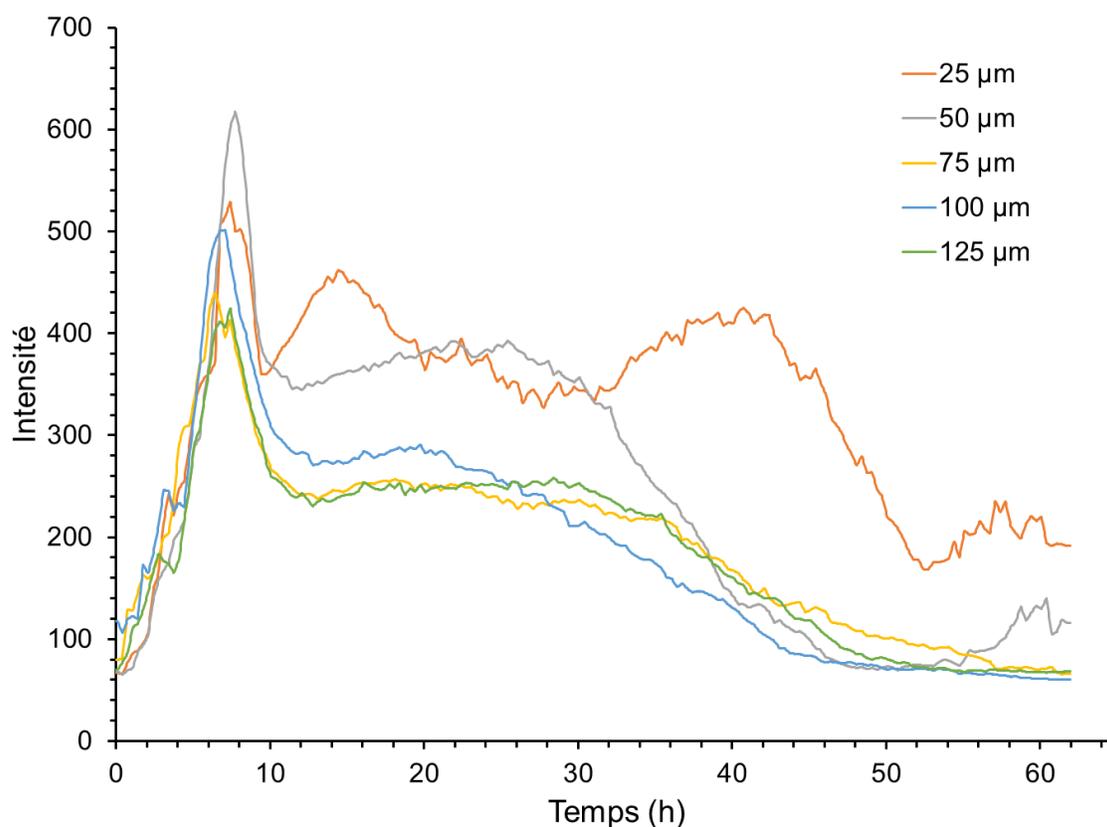


Figure 5-6 : Intensité de la fluorescence pendant la croissance à 25, 50, 75, 100 et 125 μm du coin du microcanal (orange, gris, jaune, bleu et vert, respectivement). Chaque mesure est faite sur une fenêtre de 5 μm de largeur.

Les projections dans l'axe Z (Figure 5-5) ont montré qu'il y a une ligne où l'intensité est plus faible à proximité du mur de côté du canal. Afin de mieux comprendre la forme de cette zone de faible biomasse dans le biofilm, des tranches dans le plan XZ ont été faites à partir des empilements confocaux pour différents temps pendant la croissance (Figure 5-7). Tel qu'il avait été observé à partir des projections dans l'axe Z à la Figure 5-5, au début de la croissance (Figure 5-7 A et B ; 1 et 6 heures), on voit d'abord quelques bactéries au fond du microcanal puis on voit un biofilm plutôt homogène qui recouvre toute la zone d'observation. Par la suite, on voit apparaître une zone complètement noire. Elle était précédemment observée comme

une ligne à la Figure 5-5. On peut maintenant voir que c'est en fait un canal qui a comme base la lamelle de verre au fond du microcanal et qui est entouré par le biofilm. Ce canal se déplace légèrement vers le centre du dispositif et sa forme change. Plus particulièrement, ce canal devient plus large et plus profond à la fin de la croissance du biofilm.

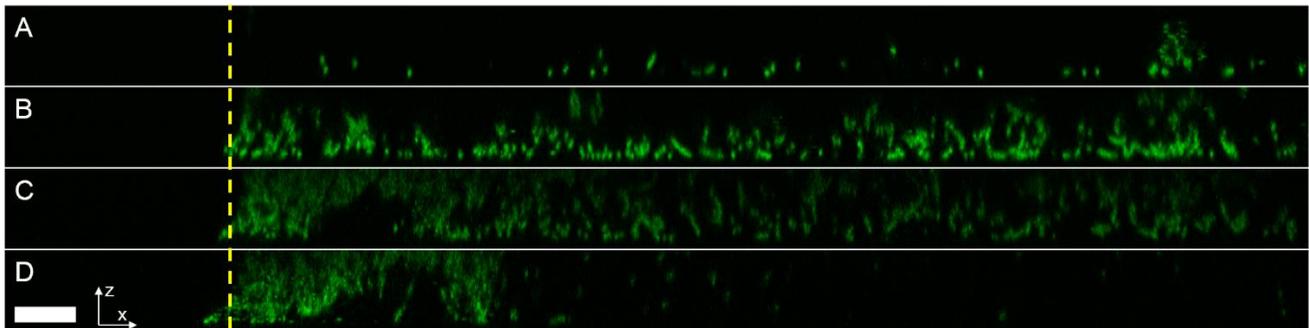


Figure 5-7 : Tranches dans le plan XZ du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 présenté à la Figure 5-5 à 1, 6, 16 et 50 heures de croissance (A, B, C et D, respectivement). L'axe X est selon la largeur l'axe Z est selon la hauteur du canal. Le mur du fond du microcanal se trouve en bas de chaque image et la ligne pointillée jaune marque la position du mur du côté. La barre d'échelle mesure 10 μm dans l'axe X et 2,5 μm dans l'axe Z.

Dans la littérature, les études qui ont été faites sur les canaux dans les biofilms de bactéries de la famille *Pseudomonas* n'ont pas permis de suivre l'évolution temporelle pendant le développement du biofilm [76]. Ces canaux pourraient favoriser le transport de nutriments dans la matrice extracellulaire. Chez *P. aeruginosa*, la production de rhamnolipides, connus comme étant de bons surfactants, a été démontrée comme étant importante dans le développement des canaux [117]. Les rhamnolipides nuisent à l'interaction cellule-cellule et leur présence dans les canaux permet donc d'éviter que des bactéries viennent les bloquer. La présence de canaux interconnectés a déjà été rapportée dans la littérature pour les biofilms de la bactérie *Bacillus subtilis* développés à l'interface

entre un milieu de culture gélifié dans de l'agar et l'air. Ces canaux faciliteraient le transport des liquides au travers du biofilm. Dans ce cas, il n'y aurait pas d'écoulement imposé et la force motrice du liquide proviendrait de l'évaporation à l'interface biofilm-air [9].

À la différence de ceux observés dans les travaux chez *B. subtilis*, la formation du biofilm pour nos travaux est directement faite dans le dispositif microfluidique et les mesures par microscopie confocale sont réalisées *in situ*. L'utilisation de la protéine fluorescente verte (GFP) pour voir les bactéries en microscopie confocale est aussi importante. En effet, les études sur les biofilms qui ont montré la présence de ces canaux en microscopie confocale ont été réalisées avec des marqueurs fluorescents qui doivent être ajoutés au biofilm à un moment précis. Cela a pour effet d'avoir de l'information à cet instant spécifique pendant la croissance, mais empêche de suivre le biofilm par la suite puisque les marqueurs fluorescents perturbent le système.

Un autre phénomène observé est le déplacement d'une partie de la biomasse pendant la croissance (Figure 5-8). Si on regarde le côté du biofilm qui est vers le centre du microcanal, on voit que les bactéries sont statiques et des lignes verticales sont observées (Figure 5-8). Cependant, au bord du microcanal, ces structures se déplacent légèrement vers le canal interne, tel que décrit à la Figure 5-5 et à la Figure 5-7. Cela se traduit par des lignes déviant vers la droite à la Figure 5-8. Lorsque ces images sont regardées en tant que vidéo intermittente, cela se voit par un mouvement des bactéries au sein du biofilm. Elles se déplacent alors constamment vers le centre canal interne pendant la croissance. Ce comportement pourrait être dû à une croissance plus rapide des bactéries sur les côtés du dispositif et par un apport de nutriments plus grand à proximité du canal interne au biofilm. Ainsi, lors de la formation du biofilm, une partie des bactéries et de la matrice extracellulaire pourrait être poussée vers le centre du microcanal par les celles formées ultérieurement.

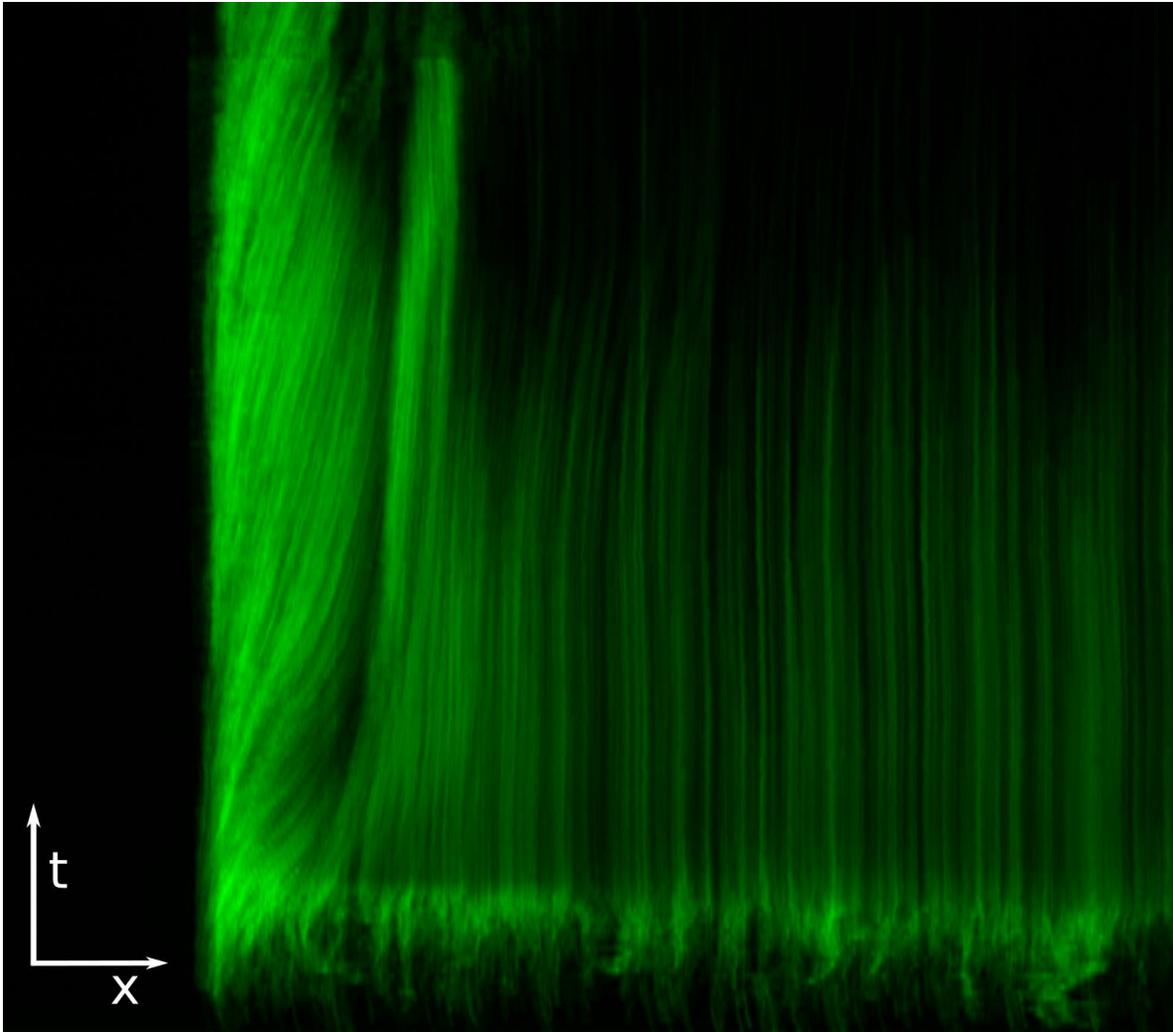


Figure 5-8 : Tranche dans le plan Xt de la projection dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07. La tranche dans le plan Xt a été faite selon la ligne pointillée rouge à la Figure 5-5. L'axe X correspond à la section transversale. La barre d'échelle en X mesure 20 μm et celle en t correspond à 10 heures.

5.4 Conclusion

La microscopie en champ clair été utilisée pour étudier la croissance à partir des côtés du microcanal des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07. La propension des biofilms à croître à partir des côtés ainsi que l'effet de la dimension du microcanal

ont été caractérisés par Kim *et coll.* pour des bactéries de la famille *Pseudomonas* dans la littérature [59]. Il avait été conclu que le développement des biofilms était régulé par les conditions hydrodynamiques. Les mesures faites en microscopie en champ clair nous ont permis de suivre l'évolution de la biomasse pendant la croissance et ainsi de voir le taux à laquelle elle augmente. Afin de comparer l'effet du ratio d'aspect du microcanal, deux dispositifs de différentes hauteurs ont été utilisés et les débits ont été ajustés afin d'avoir les mêmes forces de cisaillement moyennes. Pour un microcanal de plus grande hauteur, la biomasse augmente plus rapidement sur les côtés alors que dans le centre du microcanal, les taux d'augmentation de la biomasse sont comparables. Pour le microcanal de plus grande hauteur, nous avons observé que le débit plus élevé fait en sorte qu'il y a un plus grand apport de nutriments. Comme les forces de cisaillement sont plus faibles sur les côtés, l'effet de l'érosion par les forces de cisaillement a un effet plus négligeable qu'au centre. Ces deux effets combinés favorisent une croissance plus rapide sur les côtés du microcanal.

Afin de mieux comprendre l'impact du coin entre le fond du microcanal et le mur de côté sur la croissance, la microscopie confocale a été utilisée. Cette technique a permis d'obtenir des images à haute résolution dans le plan XY et avec une bonne résolution dans l'axe Z. Cela permet de voir avec plus de précision la structure du biofilm à cet endroit. Tel qu'attendu, le biofilm se développe de manière plus importante sur le côté du microcanal. Les projections dans l'axe Z des empilement confocaux (Figure 5-5) ont permis d'observer une ligne à proximité du mur de côté du microcanal qui est parallèle à ce dernier. À l'aide des sections dans le plan XZ des empilements confocaux, il a été possible de confirmer que cette ligne est en fait un canal à l'intérieur du biofilm. Ce biocanal est formé directement à la surface de la lamelle de verre refermant le microcanal et il est entouré des bactéries. La présence de biocanaux à l'intérieur des biofilms favorise vraisemblablement le transport des nutriments et favorise ainsi leur croissance. Effectivement, tel qu'il a été montré par microscopie en champ clair (voir Figure 5-2) la biomasse est plus grande sur les côtés. En absence de ce biocanal interne, les bactéries enfouies à l'intérieur de ce

biofilm auraient un accès très limité aux ressources aussitôt que le biofilm deviendrait épais. La possibilité de former ce type de structure dans un environnement microfluidique combiné à la caractérisation *in situ* pendant la croissance par microscopie confocale offre une opportunité intéressante pour des études futures. Plus particulièrement, cela ouvre la voie à l'étude des différents facteurs influençant la formation et le maintien de ces biocanaux. Il serait intéressant de suivre l'impact de la géométrie du microcanal et des propriétés de sa surface sur la forme du biocanal interne. Puisqu'il est proposé que la disponibilité des nutriments soit un facteur provoquant l'apparition des biocanaux, l'effet de la nature du milieu de culture (source de nutriments et concentration) devra être investigué dans le futur. L'impact du débit de l'écoulement est aussi susceptible d'avoir un effet important puisqu'il est important pour le transport de masse dans le biofilm [6, 7]. Comme les biocanaux internes sont essentiels pour leur développement [117], cela pourrait permettre de trouver ou d'évaluer de nouvelles stratégies pour le contrôle des biofilms. La méthodologie utilisée dans le cadre de ces travaux pourrait aussi être appliquée à d'autres bactéries. Le dispositif microfluidique utilisé est simple et la microscopie confocale est une méthode permettant d'observer plusieurs fluorophores qui peuvent cibler différentes biomolécules à haute résolution en trois dimensions. On pourrait ainsi observer directement les biomolécules impliquées dans la formation des biocanaux et mieux comprendre les différents facteurs qui contrôlent leur apparition.

Chapitre 6 : Impact du milieu de culture sur la structure des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07

6.1 Introduction

Les milieux de culture sont formulés de manière à inclure tous les nutriments dont les bactéries ont besoin pour leur croissance. Dans la littérature, il est fréquent d'ajouter d'autres éléments non essentiels ou même nocifs afin d'observer l'effet sur la réplification des bactéries, leur métabolisme et la formation des biofilms [3, 77]. Dans le cadre de ce chapitre, deux milieux de culture complets et favorables à la croissance des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 seront utilisés, soit un milieu complexe et un milieu minimal. La microfluidique a été utilisée afin de contrôler l'environnement pendant la croissance de manière que la seule variable soit milieu de culture. La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a été utilisée pour faire les observations puisqu'elle permet de bien résoudre et de suivre dans le temps les structures formées par le biofilm. Deux principaux phénomènes seront suivis. Dans le cas du milieu LB, un milieu riche, des *streamers* sont formés alors que dans le milieu AB, un milieu minimal, des structures compactes avec des parties libres de bactéries en surface du microcanal sont observés.

6.2 Milieux de culture

La préparation des biofilms peut être faite avec différents milieux de culture. La nature et la concentration de la source de carbone, d'azote et d'autres nutriments essentiels peut avoir un impact pour la croissance bactérienne et la formation de biofilms. Le milieu de culture LB est un milieu complexe. La principale source de carbone dans ce milieu de culture est la tryptone, un mélange de peptides résultant

de la digestion de la caséine par la protéase trypsine. Un extrait de levures est ajouté dans ce mélange et sert de source de nutriments variés. Afin de contrôler la force ionique du milieu, du NaCl est ajouté. Le pH peut être contrôlé en ajoutant un peu de NaOH.

Les milieux de culture AB et LB sont très différents. Le milieu de culture AB est un milieu de culture minimal. Comme les autres milieux de cultures minimaux, dans le milieu AB, les sources de carbone, d'azote et de phosphore et des différents minéraux essentiels pour la croissance bactérienne sont des sels simples. Dans le cas présent, la source de carbone est le citrate de sodium. Le citrate de sodium est connu comme étant un agent chélatant, ce qui pourrait avoir un impact sur la structure du biofilm. La principale source d'azote est le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le phosphate provient des sels Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 . On y retrouve aussi du NaCl, du MgCl_2 , du CaCl_2 et du FeCl_3 . Ces éléments sont importants pour la croissance des bactéries, la formation et le maintien du biofilm [24, 25].

Dans le cas du milieu LB la principale source d'azote et de carbone est la tryptone (mélange de peptide provenant de la digestion de la caséine par la trypsine). Les autres éléments essentiels à la croissance proviennent d'un extrait de levures. Ce milieu est communément utilisé en microbiologie pour la croissance des bactéries. Le milieu AB est considéré comme étant minimal puisqu'il contient des ingrédients simples et en concentration faible. Ces conditions peuvent, par exemple, se retrouver dans certains sols et dans l'eau des tours de refroidissement qui sont des environnements représentatifs du milieu naturel pour *Pseudomonas sp.* CT07 [70, 98].

Pour la croissance de *Pseudomonas sp.* CT07 en milieu de culture LB, les travaux du groupe Greener ont montré la formation de *streamers* par microscopie en champ clair en vidéo intermittente dans un microcanal droit. Dans ce cas, une partie d'une microcolonie se détache en conservant un lien d'attache avec le biofilm [62, 69]. Le suivi *in situ* de la formation d'un *streamer* par détachement partiel soudain par microscopie confocale permettra de mieux comprendre ce phénomène. Quelques

études dans la littérature sur des biofilms de la famille *Pseudomonas* préparés dans des milieux de culture minimaux comme le milieu AB indiquent qu'ils ont une structure compacte et hétérogène [8, 104].

6.3 Formation de *streamers* pour les biofilms cultivés en milieu LB

Les forces de cisaillement et le type d'écoulement ont un effet sur la croissance et la structure des biofilms. Dans certaines conditions, il y a formation de structures en forme de filaments nommées *streamers*. Ils sont importants dans les processus de prolifération des biofilms dans des conditions où il y a un écoulement. Ces structures sont problématiques dans les bioréacteurs puisqu'elles favorisent la prolifération des biofilms en plus de poser le risque de bloquer l'écoulement [118]. Par exemple, les milieux poreux comme les filtres offrent une surface idéale pour leur formation en raison de leur rapport surface/volume élevé. Cela a des implications pour les domaines comme la bioremédiation, la séquestration du CO₂ et le traitement des eaux usées. Pour cette raison, il est nécessaire de mieux comprendre les conditions favorisant leur formation et leur détachement.

En dehors du domaine de la microfluidique, les biofilms sont formés dans plusieurs conditions de flux turbulent. Stoodley et coll. ont caractérisé leur formation dans des canaux droits dans le régime turbulent. Ces travaux ont permis d'étudier la relation tension-élongation de biofilms de manière dynamique et de mesurer leurs propriétés mécaniques [119]. Le comportement des biofilms qu'ils ont étudiés dépend des forces de cisaillement. De manière générale, en microfluidique les *streamers* sont formés dans les dispositifs comportant des structures en serpentin ou avec des micropiliers mimant les milieux poreux [10, 60, 61, 78]. Ces travaux ont permis de montrer que le point d'attache des *streamers* sont reliés à des paires de vortex tournant en sens inverse. Ces vortex favorisent l'accumulation de matière sur les murs des côtés dans les canaux en serpentin et autour des micropiliers. Plus spécifiquement, ces *streamers* sont attachés directement au milieu des murs de côté

du microcanal. Ils se retrouvent ainsi suspendus entre le haut et le fond du microcanal.

Les travaux récents réalisés dans le groupe du professeur J. Greener ont démontré que des *streamers* peuvent aussi être formés dans des canaux linéaires pour les bactéries *Pseudomonas sp.* CT07 en milieu de culture LB [26, 62, 69]. Ces travaux ont montré que les *streamers* sont formés par détachement partiel soudain et qu'il y a une relation avec une augmentation de la viscosité du biofilm après sa maturation. Dans cette section, la microscopie confocale a été utilisée afin de mieux suivre leur formation à l'intérieur d'un microcanal droit. Dans le cas présent, nous avons utilisé cette technique pour caractériser la formation des *streamers* pour la première fois avec une résolution en trois dimensions. L'acquisition de plusieurs micrographies confocales *in situ* durant la croissance permettra de suivre la formation d'un *streamer* par détachement partiel soudain et son déplacement dans le microcanal lorsque le biofilm est cultivé en milieu de culture LB.

6.3.1 Résultats

La Figure 6-1 montre une projection dans l'axe Z d'un empilement confocal d'un biofilm développé dans un milieu de culture LB. Ces images ont été générées à partir de la projection dans le plan XY des empilements confocaux acquis pendant la croissance d'un biofilm. Au début de la croissance, il n'y a que des bactéries attachées à la surface de la lamelle de verre dans le dispositif microfluidique. Par la suite, des microcolonies se forment autour des premières bactéries. Ces structures continuent de croître et elles deviennent plus hautes. À partir de 30 heures (Figure 6-1 E) la partie supérieure se détache et se déplace dans le sens de l'écoulement. Elle s'éloigne aussi de la base du biofilm. En même temps, le reste du biofilm autour se développe et se densifie. D'autres structures similaires peuvent aussi être vues dans l'empilement confocal. Afin de mieux voir celle qui est décrite ici, seulement cette partie de l'image a été montrée.

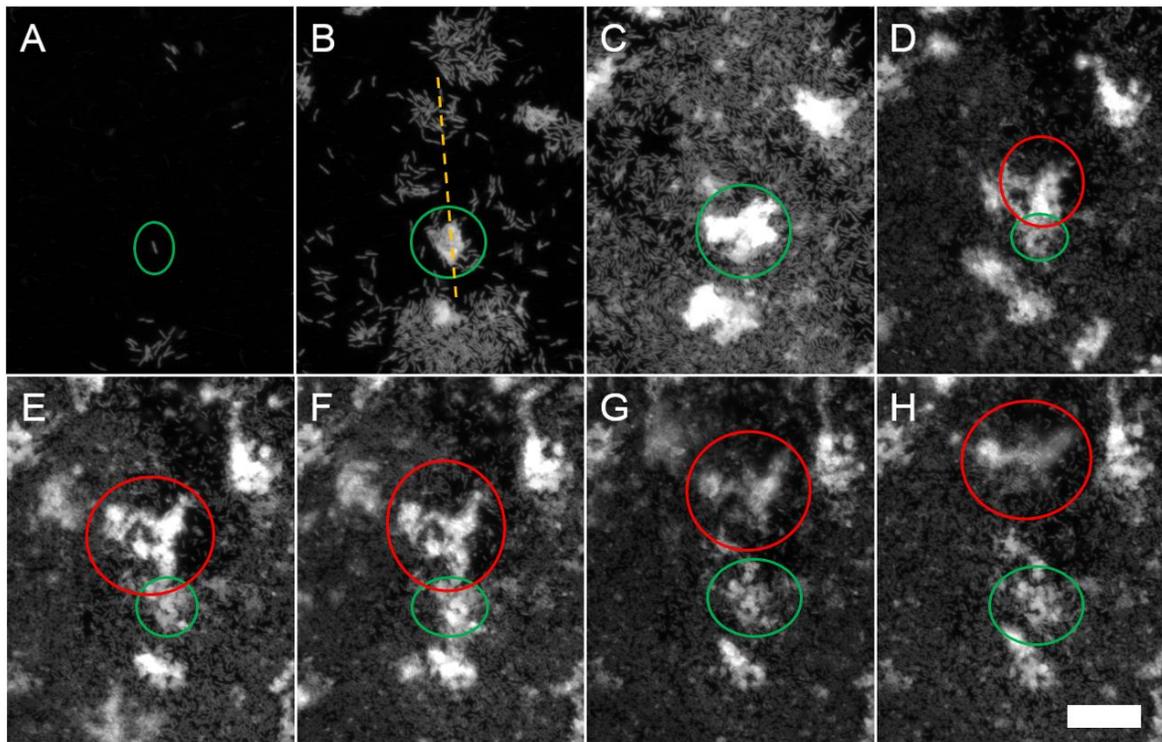


Figure 6-1 : Projection dans l'axe Z des empilement confocaux obtenus par microscopie confocale identifiant la formation de *streamer* dans le dispositif microfluidique après 15 (A), 19,5 (B), 22,5 (C), 27 (D), 30 (E), 31,5 (F), 33 (G) et 34,5 (H) heures de croissance. Le biofilm est formé par les bactéries *Pseudomonas sp.* CT07 et un milieu de culture LB est utilisé. Les empilements confocaux ont été acquis avec un objectif 40x sur profondeur de 24 μm . Ces images ont été générées en calculant la moyenne des différents plans XY de l'image confocale afin de mieux observer le déplacement de ces structures. Les cercles verts indiquent la position de la base du *streamer*. Les cercles rouges indiquent la position de la tête du *streamer*. La ligne brisée orange en (B) marque la région utilisée pour générer les coupes dans l'axe Z à la Figure 6-2. L'écoulement du milieu de culture dans le microcanal se fait du bas vers le haut. La barre d'échelle mesure 25 μm .

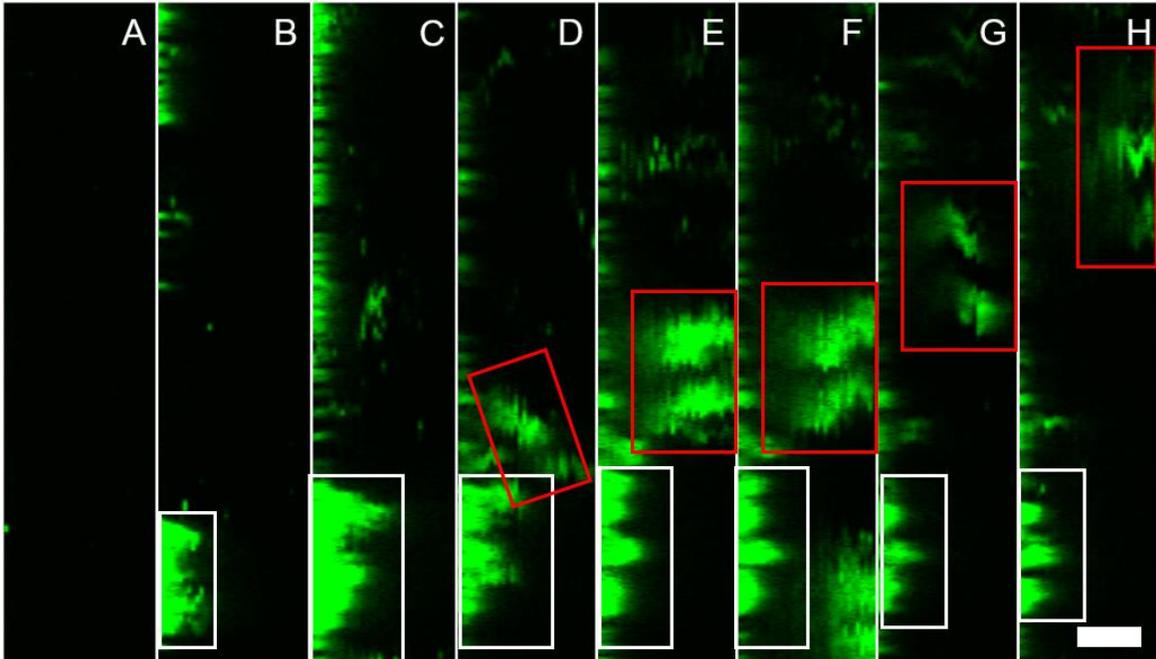


Figure 6-2 : Coupe dans l'axe Z de l'empilement confocal CLSM du *streamer* selon la ligne brisée orange à la Figure 6-1 après 15 (A), 19,5 (B), 22,5 (C), 27 (D), 30 (E), 31,5 (F), 33 (G) et 34,5 (H) heures de croissance. Les rectangles blancs indiquent la position de la base du *streamer*. Les rectangles rouges indiquent la position de la tête du *streamer*. Le fond du microcanal se retrouve du côté gauche des images et la direction de l'écoulement est du bas vers le haut. La barre d'échelle mesure 10 μm et est valide pour toutes les images.

La Figure 6-2 montre une coupe dans l'axe Z de l'empilement confocal suivant le *streamer* observé dans la Figure 6-1. Cela permet de mieux voir la position du *streamer* pendant la croissance. Pour commencer, on voit un seul point vert pour la bactérie attachée au fond du microcanal et qui sera le point de départ de la microcolonie. La colonie devient graduellement plus large et plus haute. À partir de 19,5 heures (Figure 6-2 B), on commence à observer une colonie qui est placée au point d'attache initial. De plus, à 30 heures (Figure 6-2 E), on voit que la partie supérieure du biofilm qui avait aussi été observée aux Figure 6-2 E à H commence à se détacher de la base. À partir de ce moment, au lieu de voir un biofilm continu, il y a une partie qui reste au fond du microcanal alors qu'il y a une autre qui se trouve un peu plus loin dans le sens de l'écoulement. À 33 et 34,5 heures (Figure 6-2 G et

H) la partie supérieure se retrouve complètement détachée de la base et se retrouve pratiquement en dehors de la zone d'observation. Elle reste toutefois stationnaire pendant plusieurs heures. Cela indique que les *streamers* doivent être connectés avec la base du biofilm. À ce moment, les bactéries ne connectent plus les deux segments ensemble. La microscopie confocale à balayage laser nécessite un échantillon fluorescent. Dans le cas présent, le fluorophore est la protéine fluorescence verte (GFP) qui est exprimée par les bactéries. Par conséquent, seulement les bactéries sont observées pendant ces mesures. Dans le cas présent, nous concluons que cette structure est effectivement un *streamer* qui est reliée à la base par la matrice extracellulaire. Comme cette dernière ne contient pas de bactéries, elle est invisible bien qu'elle puisse relier la tête du streamer à la base.

6.4 Formation de structures compactes pour les biofilms en milieu de culture AB.

Afin de vérifier l'effet du milieu de croissance sur la formation des *streamers*, une expérience a été faite dans les mêmes conditions hydrodynamiques avec un milieu AB modifié. La Figure 6-3 montre la projection dans l'axe Z de l'empilement confocal sur une profondeur de 13 μm à différents temps de croissance dans ces conditions. Contrairement à la Figure 6-1 où un *streamer* est identifié, le biofilm est relativement homogène avec quelques petites structures en surface. De plus, il n'y a pas de partie qui se détache pendant la croissance. Afin de voir si ces petites structures sont localisées à la surface d'attache du biofilm, des projections dans l'axe Z du même empilement confocal sur une profondeur de 2,2 μm pendant la croissance ont été faites (Figure 6-4). On observe alors que la présence de structures est beaucoup moins importante qu'en milieu riche et que le biofilm est beaucoup plus uniforme. On peut donc conclure que la partie inférieure du biofilm couvre le fond du microcanal de manière uniforme dans la région observée. Les parties supérieures du biofilm sont toutefois plus structurées.

Ces observations indiquent que la source de nutriments et de minéraux a un impact important sur la croissance et sur la structure du biofilm. Ce type de croissance est comparable à ce qui a été précédemment observé pour la croissance de biofilms de la famille *Pseudomonas* en milieu de culture minimal [8, 104]. Il a notamment déjà été démontré que des effets comme la concentration en sel est importante pour les propriétés mécaniques comme la viscosité [26].

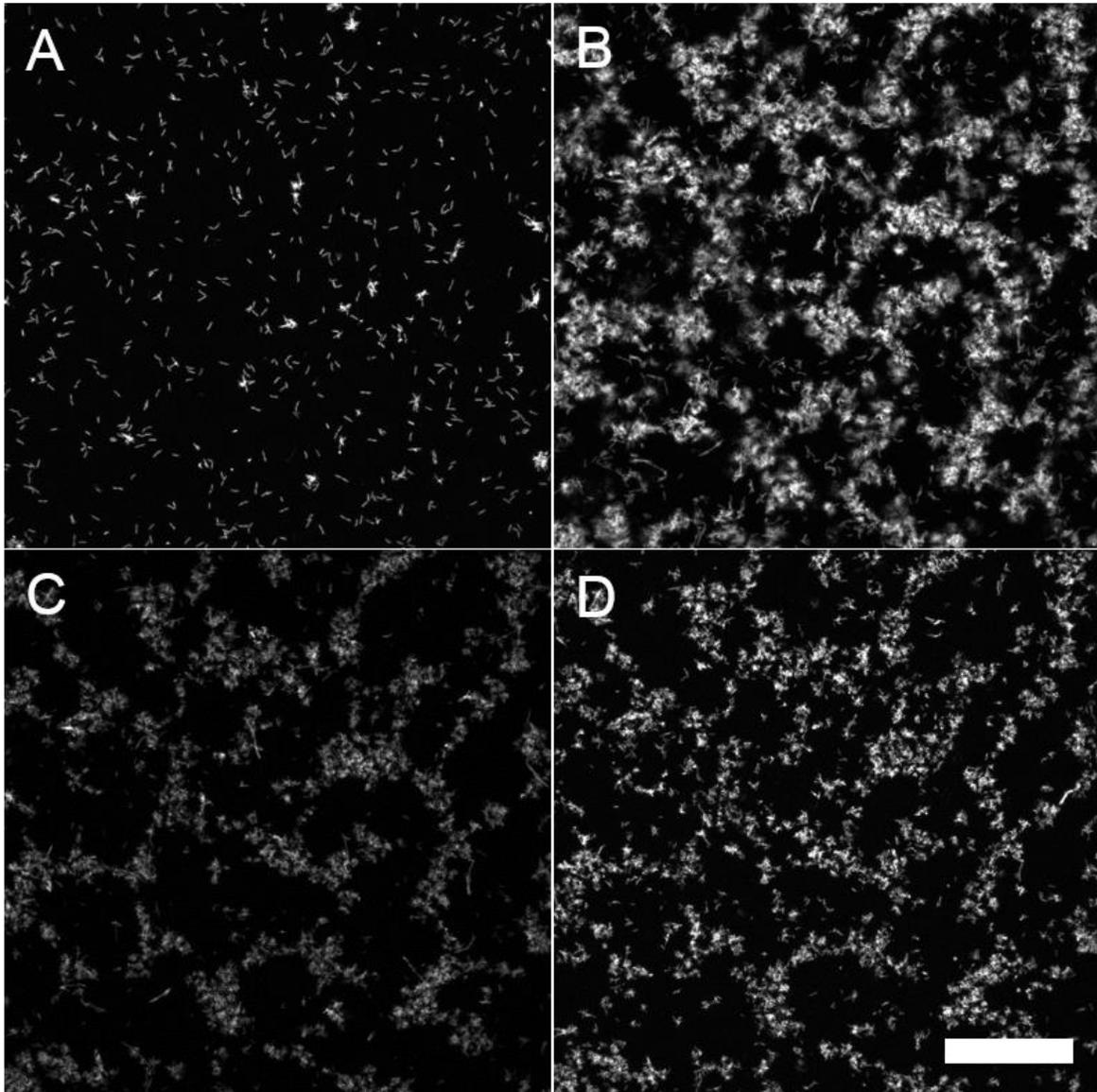


Figure 6-3 : Projections dans l'axe Z de l'empilement confocal CLSM d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 1 (A), 11 (B), 33 (C) et 55 (D) heures après l'inoculation du microcanal. Un milieu de culture AB est utilisé. Les empilements confocaux ont été acquis avec un objectif 60x sur profondeur de 13 μm . Ces images ont été générées en calculant la moyenne des différents plans XY de l'image confocale afin de mieux observer le déplacement de ces structures. La barre d'échelle mesure 50 μm

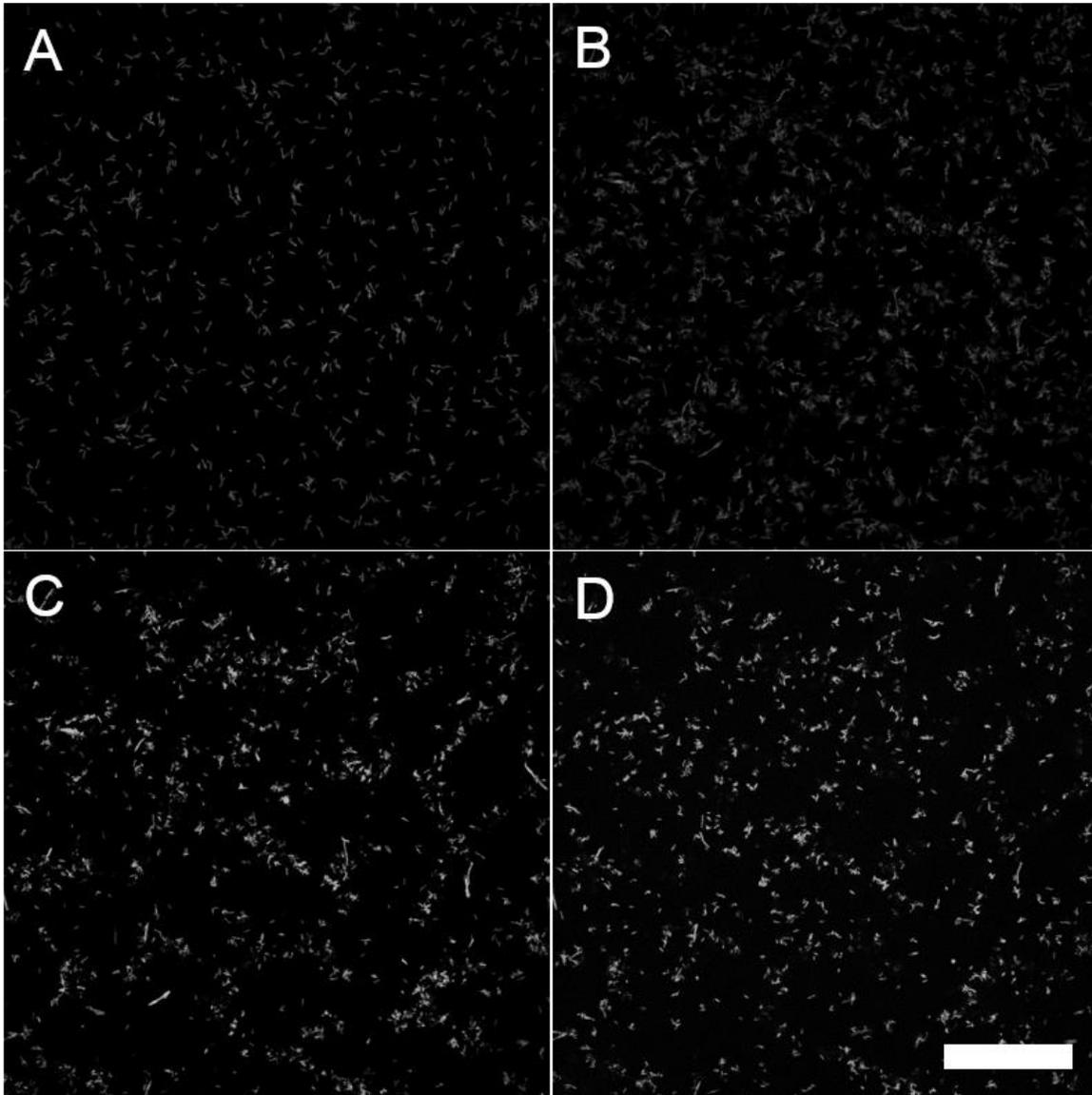


Figure 6-4 : Projections dans l'axe Z sur les premiers 2,2 μm au-dessus du fond du microcanal dans l'empilement confocal CLSM d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 1 (A), 11 (B), 33 (C) et 55 (D) heures après l'inoculation du microcanal. Un milieu de culture AB est utilisé. La barre d'échelle mesure 50 μm .

Afin de mieux voir les différences entre l'arrangement des structures compactes et hétérogènes du biofilm observé pendant sa croissance en milieu minimal, nous avons mesuré sa dimension fractale à différentes distances par rapport au fond du microcanal (Figure 6-5). Cette méthode d'analyse permet de quantifier le degré de

modelage d'une surface par un biofilm [104]. À titre de référence, une structure unidimensionnelle a une dimension fractale de 1. Pour une structure bidimensionnelle elle est de 2. Entre le début de la croissance et jusqu'à environ 9 heures, la dimension fractale du biofilm augmente. Les valeurs de dimensions fractales mesurées sont comparables à celles observées par Jang et coll. pour des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* en microfluidique dans un milieu de culture minimal [104]. Par la suite, une diminution rapide de la dimension fractale est observée entre 9 et 12 heures puis il y a une diminution lente et constante jusqu'à la fin de l'expérience (40 heures). Les valeurs de dimension fractale qui augmentent au début de la croissance sont représentatives d'un système qui devient plutôt à deux dimensions. L'évolution des valeurs de dimension fractale pendant la croissance est différente pour les différentes couches du biofilm. Au fond du microcanal, la dimension fractale commence à augmenter plus tôt que pour les couches supérieures. La diminution de la dimension fractale après 9 heures est aussi beaucoup plus grande pour les couches inférieures, donc la restructuration du biofilm est plus importante à cet endroit.

Dans le cas présent, au début de la formation du biofilm, la présence de bactéries relativement isolées (voir Figure 6-3 A) est reflétée par une dimension fractale faible. Après la croissance rapide, le biofilm est à son maximum d'homogénéité (voir Figure 6-3 B) et les valeurs de dimension fractale sont maximales. La diminution observée par la suite est révélatrice de la formation plus prononcée de structures régulières (voir Figure 6-3 C et D). La formation de ces structures semble être liée à la densification de parties surélevées du biofilm avec des zones où on retrouve de moins en moins de bactéries.

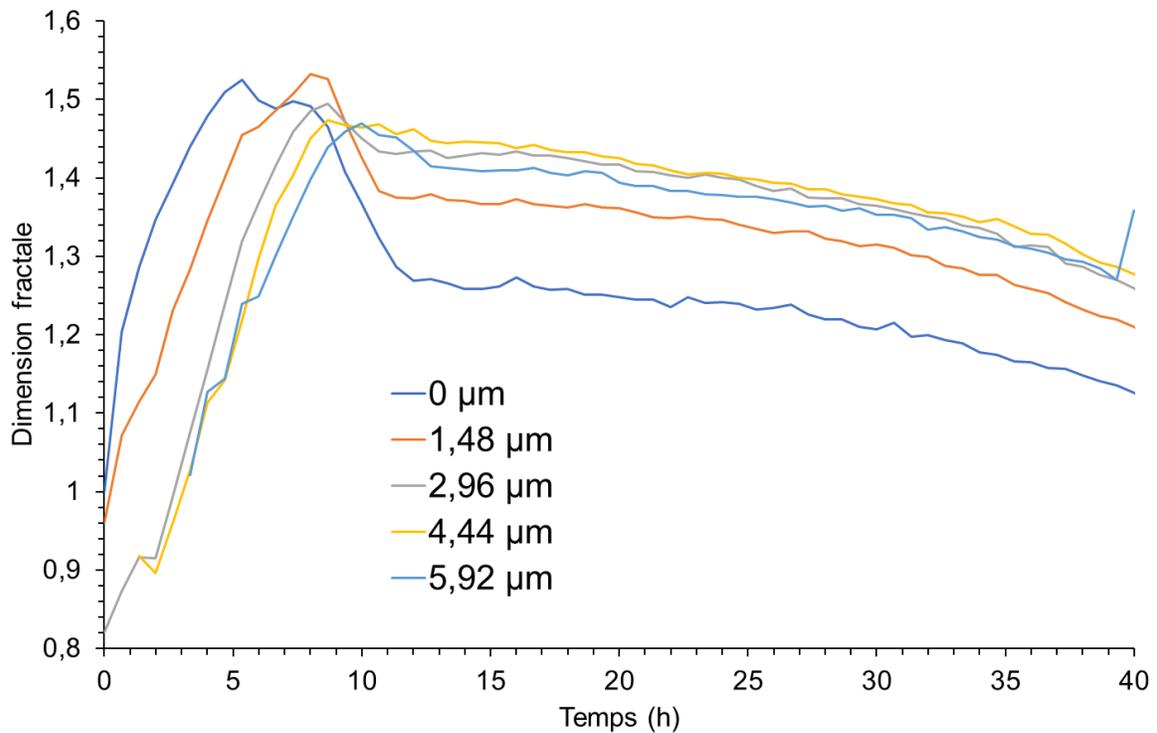


Figure 6-5 : Dimension fractale du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 pendant sa croissance en milieu de culture AB avec 10 mM de citrate de sodium à différentes profondeurs.

6.5 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent la formation de *streamers* dans un microcanal droit pour les biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 en milieu LB. En milieu AB, ils forment des structures compactes. D'abord, les projections dans l'axe Z permettent d'identifier des structures qui se développent autour des microcolonies formées par les premières bactéries qui s'attachent à la surface. Ensuite, l'aire de ces structures augmente. Dans certains cas, ces structures prennent des formes complexes. Enfin, la tête des *streamers* s'éloigne de la base. Ce changement se fait à la fois dans l'axe Z et dans le sens de l'écoulement. Les résultats en microscopie confocale ne permettent pas de voir ce qui fait le lien entre les deux parties. Cette technique permet seulement de voir les bactéries, ce qui suggère la présence de

matrice extracellulaire entre la tête et la base. L'effet du milieu de culture sur la formation des *streamers* a été vérifiée en répétant l'expérience avec un milieu AB. Dans ce cas, il n'y a pas de *streamers* et le biofilm est relativement homogène. Les structures observées sont très répétitives et ne se démarquent pas du reste du biofilm.

La plus grande disponibilité des nutriments et de la source de carbone ainsi que sa forme plus facilement assimilable dans le milieu LB pourrait expliquer la formation des *streamers*. En ayant un milieu où la croissance du biofilm et des bactéries est favorisée, il y a un avantage à ce qu'une partie du biofilm se détache afin de pouvoir coloniser une nouvelle surface en aval. Selon la littérature, les *streamers* auraient besoin de peu d'adaptation pour commencer un nouveau biofilm lorsqu'ils seraient en contact avec un nouvelle surface [10]. En comparaison, les biofilms avec le milieu AB ne forment pas de *streamers*. Il est possible que le milieu relativement pauvre défavorise la formation des *streamers* ainsi que d'autres structures qui provoqueraient une dissémination plus rapide du biofilm [120].

Chapitre 7 : Dispositif microfluidique pour l'étude *in situ* par spectroscopie Raman exaltée par les plasmons de surface (SERS)

7.1 Introduction

La microfluidique est un outil très utile pour étudier différents processus biologiques comme la croissance des biofilms puisqu'elle permet un grand contrôle des paramètres de croissance, une diminution de la consommation de milieux de culture ou de réactifs et de protéger le milieu de croissance des conditions ambiantes. Les méthodes de fabrication des canaux microfluidiques rendent possibles une optimisation rapide de canaux complexes [121, 122]. On peut par exemple faire des mesures en parallèle [123] et intégrer plusieurs composantes fonctionnelles comme des électrodes, des valves et des éléments pour le contrôle de la température [96, 124, 125]. Tel que mentionné précédemment, la microfluidique appliquée à l'étude des biofilms est intéressante puisqu'on peut contrôler les forces de cisaillement sur les murs, la température et différents gradients. Les biofilms sont généralement caractérisés par microscopie conventionnelle, de fluorescence ou confocale [8, 10, 126].

Plusieurs méthodes pour faire de la spectroscopie Raman exaltée ont été utilisées dans la littérature. La technique la plus commune consiste à faire circuler des nanoparticules d'argent ou d'or dans le microcanal et à les mélanger avec la solution d'analyte [85-87, 127]. Il est possible d'augmenter l'intensité du signal en provoquant l'agrégation des nanoparticules de manière contrôlée en les faisant co-circuler avec une solution saline [84]. Les nanoparticules ont généralement tendance à adhérer sur les murs des microcanaux, augmentant ainsi de manière passive l'intensité du signal [128, 129]. Puisque les nanoparticules doivent circuler dans le microcanal,

une grande quantité de solution de nanoparticules doit être utilisée pour une expérience à long terme. Afin de contrer ces problèmes, plusieurs auteurs ont développé des méthodes pour préparer des surfaces actives en SERS au fond du microcanal. Cela confère une plus grande stabilité à la structure métallique et présente l'avantage d'être localisé au même endroit où l'on obtient le dépôt et la croissance des biomatériaux. La photoréduction de précurseurs d'argent et le recuit thermique rapide de films d'or minces permettent d'obtenir des surfaces nanostructurées d'argent [88, 89] et d'or [90] qui sont actives en SERS. Ces techniques nécessitent toutefois l'utilisation de laser pulsé femtoseconde et de laser UV. Cela est problématique pour plusieurs matériaux communément utilisés en microfluidique puisqu'ils peuvent induire des dommages photo induits ou reliés à la chaleur. L'autre approche utilisée dans la littérature est la déposition de métal sur un substrat nanostructuré directement dans un microcanal [91-94]. Cette méthode nécessite toutefois plusieurs étapes de photolithographie qui sont complexes avant la déposition de métal.

Dans ce chapitre, une méthode simple pour la fabrication d'un substrat SERS pour l'imagerie spectrale *in situ* dans un dispositif microfluidique sera présentée. Elle permet d'obtenir un rehaussement du signal Raman et donne la possibilité de déposer une couche métallique sur toute la surface du microcanal sans obstruer le parcours optique. Un dispositif à deux étages a aussi été conçu afin de faire co-circuler la solution d'analyte avec une solution de confinement. Cela nous a permis de confiner la solution d'analyte au fond du microcanal où se situe le substrat SERS. Ces fonctionnalités seront démontrées en faisant une image spectrale unidimensionnelle de la concentration locale d'un précurseur de biofilm dans un microcanal. Ces résultats seront comparés à des micrographies de deux flux de solution colorées dans les mêmes conditions.

7.2 Profil d'écoulement dans le dispositif microfluidique

Avant de procéder aux mesures SERS, il est utile de déterminer le profil d'écoulement dans le dispositif microfluidique à deux étages qui est présenté à la section expérimentale. La microscopie en champ clair a été utilisée pour ces mesures. Un dispositif sans la couche métallique est utilisé puisqu'il est nécessaire que l'échantillon soit transparent. Une solution colorée en bleu représente l'analyte et est insérée dans l'entrée 1 afin d'être confinée au centre du microcanal. Une solution colorée en rouge représente la solution de confinement et est insérée dans l'entrée 2. La Figure 7-1 A montre une micrographie de ce dispositif prise près de la jonction où l'analyte est ajouté. Les valeurs de pixel pour les canaux rouge et bleu de la caméra couleur ont été extraites dans la section transversale du microcanal (voir Figure 7-1 B). Elles ont ensuite été normalisées afin que les valeurs les plus faibles pour les deux canaux soient à zéro et que leurs maxima aient la même intensité. Les profils des deux écoulements montrent des tendances opposées. Le profil de l'analyte est maximal au centre du canal alors que celui de la solution de confinement est maximal sur les côtés. La transition entre les deux se fait graduellement. Dans des conditions de flux laminaire, le mélange entre deux solutions se fait seulement par diffusion. Puisque la mesure est faite directement à la jonction, on peut considérer que le profil observé n'est pas dû à la diffusion. L'absorbance pour un composé est reliée à son absorptivité, à sa concentration et au parcours optique. Comme les deux premiers facteurs restent constants, il faut que le parcours optique varie. Bien que cela ne permet pas de définir précisément sa forme, cela suggère que la base est plus large que le haut que qu'il y a un étranglement graduel de l'écoulement de l'analyte (en bleu) en s'éloignant du fond du microcanal.

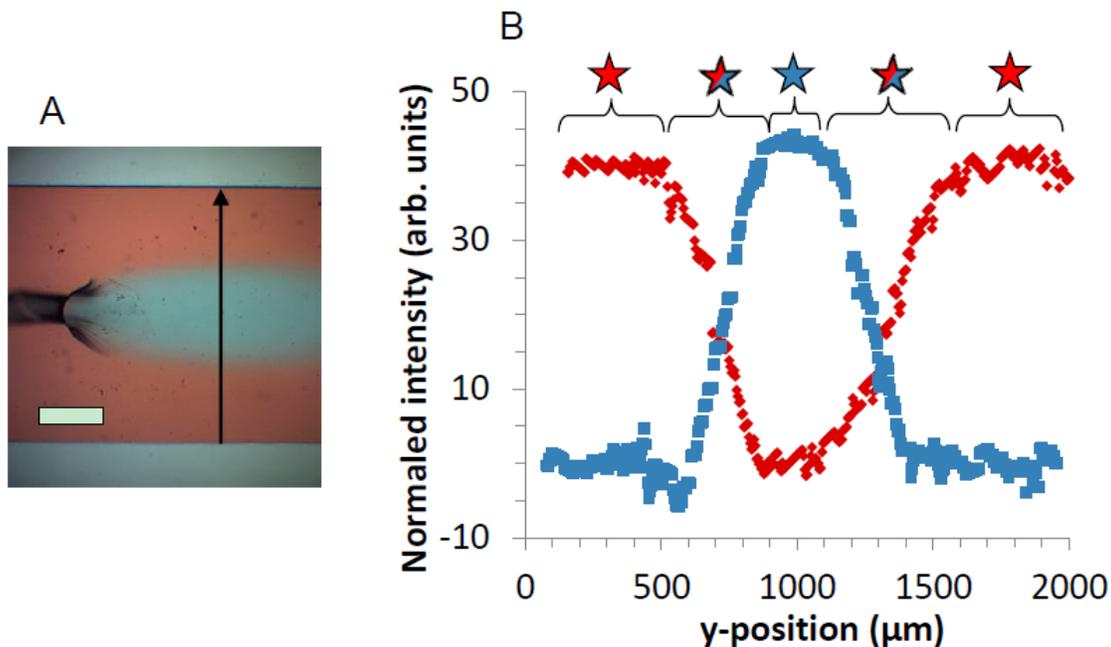


Figure 7-1 A) Micrographie en champ clair avec une caméra couleur pour un écoulement avec des liquides colorés avec des débits de 0,34 mL/h et 0,14 mL/h (en rouge et en bleu, respectivement). B) Valeurs de pixel normalisées pour les canaux bleu et rouge de la caméra couleur dans la section transversale du microcanal représentée par la ligne noire en A). Une étoile bleue montre les régions correspondant au liquide de confinement et une étoile rouge pour l'analyte. Les parties où les deux sont observés sont identifiés par une étoile avec les deux couleurs. La barre d'échelle dans A) mesure 500 μm .

7.3 Caractérisation des surfaces d'argent

Les surfaces préparées directement après déposition de l'argent présentent une faible augmentation du signal Raman attribuable à la surface légèrement rugueuse produite par la réaction de Tollens. L'exposition au plasma d'air permet d'améliorer l'effet SERS des surfaces d'argent. Ce traitement est connu pour nanostructurer davantage les surfaces et nettoyer les composés organiques résiduels présents après la déposition. Ces effets sont causés par la pulvérisation des atomes ionisés du plasma et par oxydation [107, 130, 131]. Les effets du traitement par plasma ont été caractérisés par spectroscopie UV-Vis en réflectance, par microscopie à force

atomique (AFM) et par spectroscopie Raman. La Figure 7-2 montre les images AFM de la surface d'argent après déposition et suivant le traitement par plasma d'air. Les deux surfaces possèdent des structures larges de forme plutôt arrondie. La principale différence observée pour celle après le traitement est que ces structures deviennent plus irrégulières. Cela a généralement pour effet d'augmenter l'effet Raman pour une surface [81].

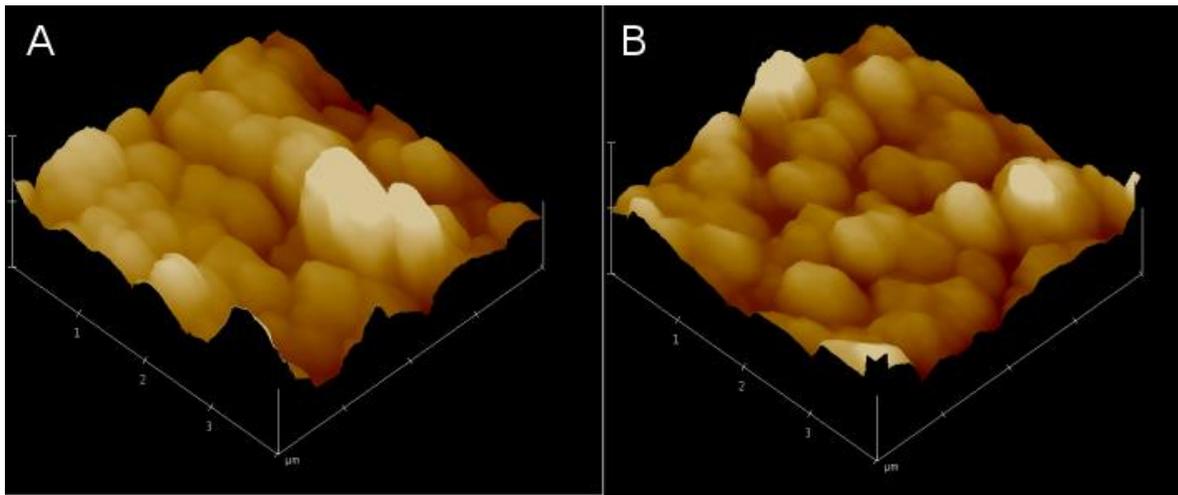


Figure 7-2 : Image AFM en mode de percussion de la surface nanostructurée d'argent avant (A) et après 20 minutes de traitement par un plasma d'air (B). L'échelle dans les plans X et Y est de 1 μm /division. Les images ont été acquises sur une aire de 100 μm^2 à une fréquence de balayage de 0,25 Hz.

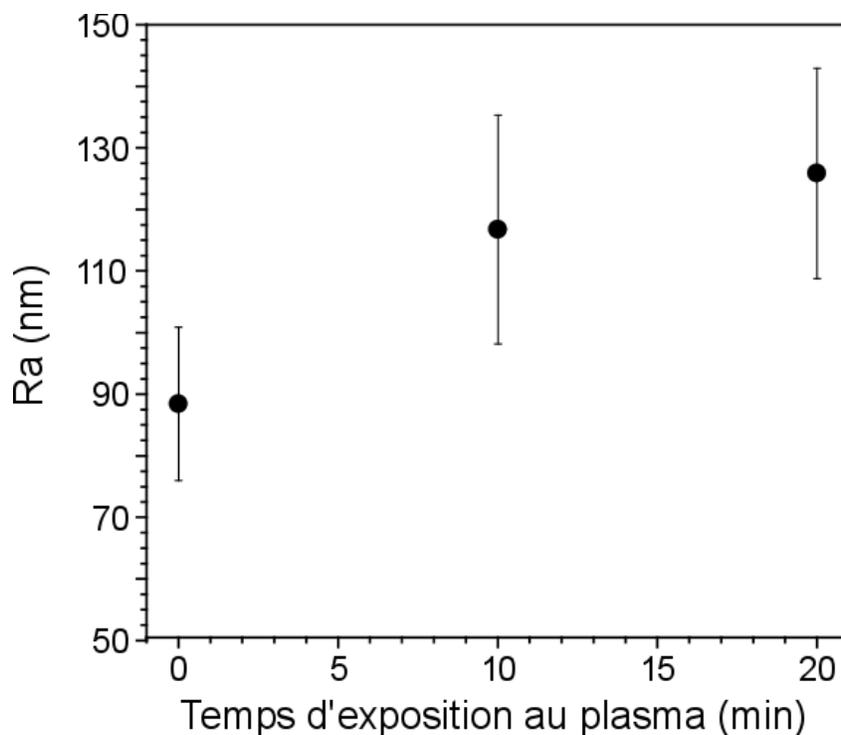


Figure 7-3 : Facteur de rugosité (R_a) des surfaces d'argent déterminé à partir des images AFM pour différents temps d'exposition à un plasma d'air.

Tel qu'observé à la Figure 7-3, les analyses de rugosité faites à partir des images AFM indiquent qu'elle augmente d'environ 40% dans les premières 20 minutes d'exposition. Ces résultats correspondent bien à ce qui a été observé précédemment dans la littérature [132, 133]. Les bandes d'absorption plasmonique dans le domaine UV-Visible en réflectance diffuse ont été caractérisées. On peut voir à la Figure 7-4 A qu'elles augmentent en intensité et qu'elles deviennent plus larges lors du traitement par plasma d'air. On observe aussi que le centre des bandes reste à la même longueur d'onde. La Figure 7-4 B montre l'intensité en Raman pour la bande $\nu\text{C-COO}^-$ du citrate de sodium sur surfaces d'argent pour différents temps d'exposition à un plasma d'air. Après 20 minutes d'exposition, le signal Raman est fortement augmenté. La longueur d'onde de la source d'excitation laser est 514,5 nm. Tel qu'observé dans les spectres UV-Vis à la Figure 7-4 A, l'absorbance est plus élevée. Cela indique qu'il y a une plus grande absorption des plasmons de surface, ce qui explique pourquoi on obtient un effet SERS. Afin de mieux suivre

l'effet du traitement plasma sur la surface d'argent nanostructurée, une déconvolution spectrale des spectres UV-Vis en réflectance diffuse a été faite afin de mieux suivre l'effet du traitement plasma sur la surface d'argent. La Figure 7-5 A montre le spectre d'une surface après dix minutes de traitement plasma. Trois bandes ont été utilisées pour cette déconvolution et elles sont centrées à 397, 439 et 466 nm. La Figure 7-5 B montre l'intensité de ces trois bandes qui a été déterminée par déconvolution. L'intensité pour les trois bandes augmente toutes jusqu'à 16 minutes de traitement plasma puis reste stable. L'effet est plus prononcé pour la bande à 397 nm que pour les autres.

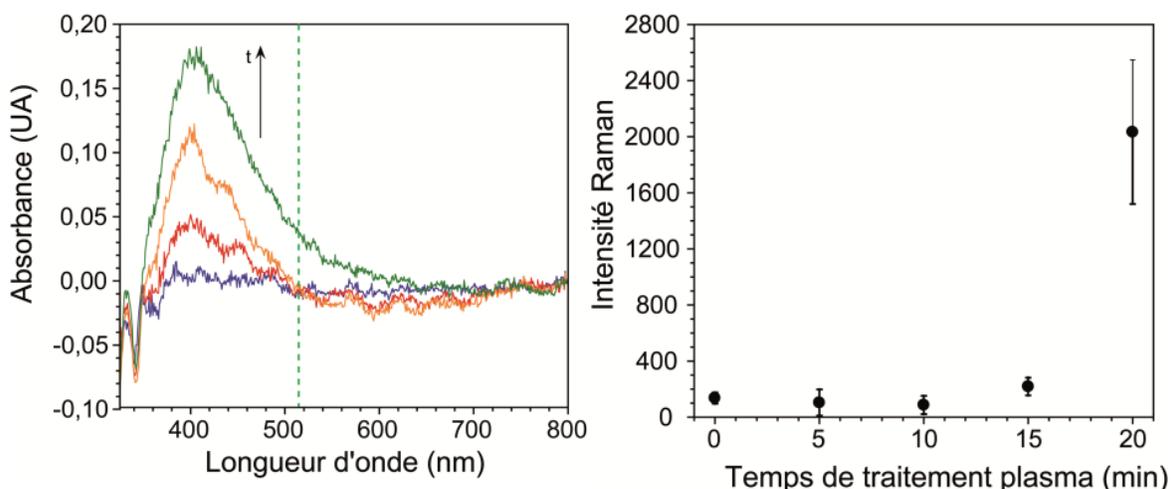


Figure 7-4 : A) Spectres UV-vis en réflectance diffuse de la surface nanostructurée d'argent après 1, 5, 10 et 19 minutes (courbes bleue, rouge, orange et verte, respectivement) de traitement plasma. Pour chaque spectre, le spectre de la surface d'argent après déposition a été utilisé comme référence. La ligne brisée verte correspond à la longueur d'onde du laser utilisé pour les mesures Raman. B) Intensité Raman pour la bande $\nu\text{C-COO}^-$ du citrate à 952 cm^{-1} à différents temps d'exposition au plasma avec la source d'excitation à $514,5\text{ nm}$. Les barres d'erreur ont été générées pour des mesures séparées à différents endroits sur le même substrat.

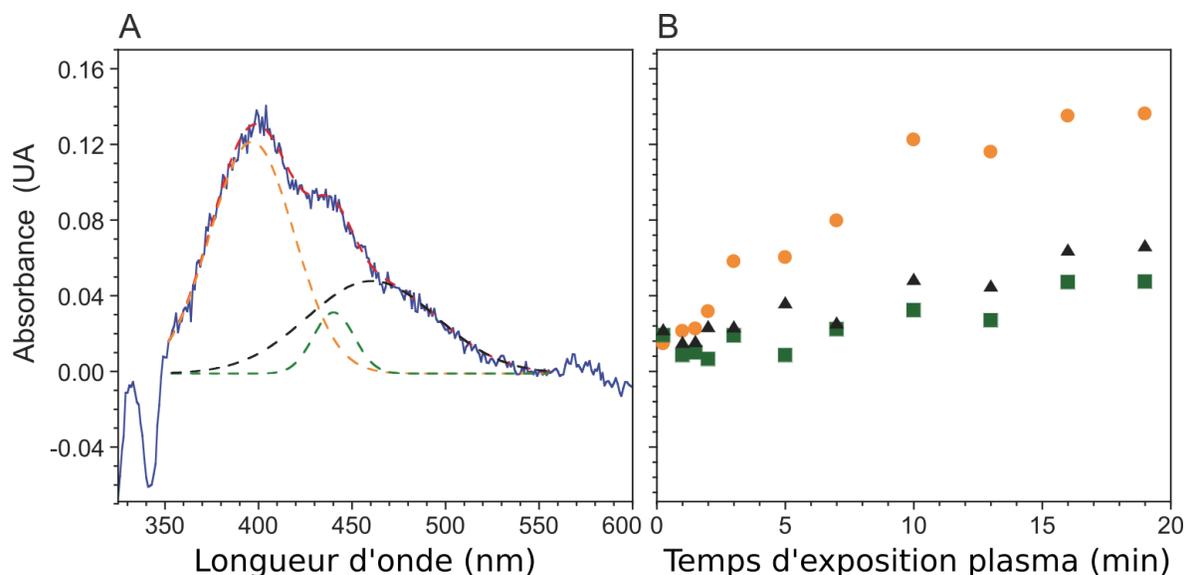


Figure 7-5 : A) Déconvolution spectrale d'un spectre UV-visible en réflectance diffuse (ligne continue bleue) de la surface d'argent nanostructurée après exposition à un plasma d'air (600 mTorr, 29,6 W). Les trois bandes utilisées pour la déconvolution spectrale sont centrées à 397, 439 et 466 nm (lignes discontinues en orange, vert et noir, respectivement). B) Intensité des bandes à 397, 439 et 466 nm (points orange, carrés verts et triangles noirs, respectivement) obtenues par déconvolution des spectres à différents temps d'exposition au plasma.

7.3.1 Calibration de la surface active SERS

L'efficacité des surfaces d'argent préparées pour le SERS dans des microcanaux a été testée premièrement en déterminant la limite de détection à partir d'une courbe de calibration, deuxièmement en vérifiant que le signal obtenu est indépendant du débit et finalement en s'assurant qu'on ait une réponse rapide après un changement de concentration de l'analyte.

L'intensité du signal Raman exalté pour différentes concentrations connues d'un analyte est d'abord utilisée afin d'obtenir une courbe de calibration. Cela nous permettra de déterminer la concentration d'analyte dans un échantillon. Cela est particulièrement important pour les surface actives SERS dans un microcanal puisque l'augmentation plasmonique est sensible à la méthode de fabrication et peut varier entre les échantillons. La bande $\nu\text{-COO}^-$ à 952 cm^{-1} (Figure 7-6 A) du citrate

de sodium est utilisée pour la courbe de calibration. Cette bande est préférable à la bande νCH_2 puisqu'elle est plus intense et elle ne chevauche pas la bande $\nu\text{O-H}$ de l'eau qui est utilisée pour la normalisation du signal. La Figure 7-6 B montre l'intensité normalisée de la bande à 952 cm^{-1} . Les spectres ont été acquis en utilisant la surface active SERS préparée tel qu'il est indiqué dans la section expérimentale avec un temps d'acquisition de 60 secondes et une intensité du laser de 10 mW. Un débit de 0 mL/h a été utilisé afin d'éliminer un refroidissement de la surface causé par l'écoulement afin de démontrer l'utilité d'une faible puissance laser et d'éviter la production de bulles induites par la chaleur. Pour des mesures avec une puissance de 100 mW, des bulles étaient formées sur la surface SERS, sauf lorsque des débits élevés étaient utilisés. La diminution de l'énergie amenée au système par le laser a aussi d'autres avantages notables. On évite la photodégradation de l'analyte ainsi que les distorsions dans l'écoulement par convection produit par chauffage local sur la surface. La Figure 7-6 B montre la courbe de calibration linéaire pour la bande à 952 cm^{-1} du citrate de sodium entre 0,1 et 5 mM. Les concentrations plus faibles n'ont pas été mesurées puisque cet intervalle est suffisant pour les présents travaux. De plus, une non-linéarité du signal en fonction de la concentration peut se produire en dehors de cet intervalle [90, 134]. À des concentrations plus faibles que 0,1 mM, la pente est plus grande. C'est pour cette raison que la droite ne passe pas par zéro. À titre de comparaison, sans le substrat SERS, la limite de détection était de 10 mM avec un temps d'acquisition de 600 secondes et une puissance de laser de 250 mW. Une plus grande sensibilité en dessous du millimolaire devrait permettre des études futures en cinétique pour la dégradation du citrate catalysée par les biofilms. De plus, la diminution du temps d'acquisition permet de prendre davantage de spectres dans un laps de temps donné, ce qui est un avantage pour l'imagerie spectrale.

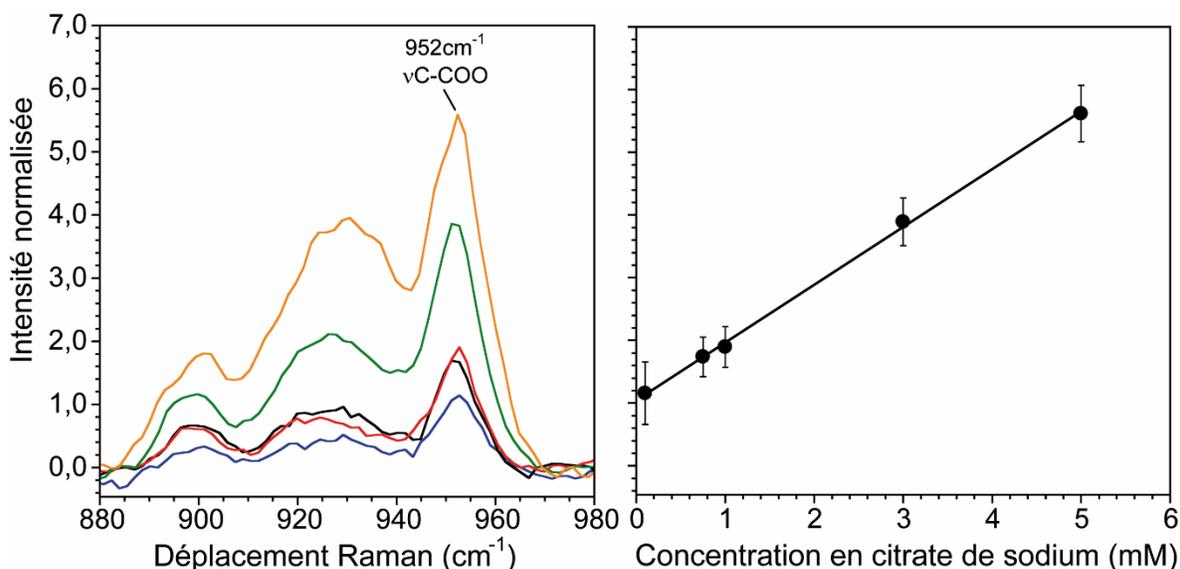


Figure 7-6 : A) Spectres Raman du citrate de sodium sur la surface active SERS dans la région $\nu\text{C-COO}^-$ à des concentrations entre 0,1 et 5 mM. Les acquisitions ont été faites avec un laser vert à 514,5 nm à une puissance de 10 mW et un temps d'acquisition de 60 s. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande $\nu\text{O-H}$ de l'eau à 3535 cm^{-1} . Chaque spectre correspond à la moyenne de cinq spectres à la même concentration. B) Courbe de calibration pour le citrate de sodium à partir de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ à 952 cm^{-1} . L'écart type pour quatre mesures à chaque concentration a été utilisée pour les barres d'erreur.

Des mesures ont ensuite été faites afin de s'assurer que l'écoulement n'a pas d'effet sur les mesures. Pour ces expériences, une solution 5 mM de citrate de sodium a été introduite dans le microcanal à des débits entre 0 mL/h et 3 mL/h. Pour chaque débit, plusieurs spectres ont été acquis avec une puissance du laser de 10 mW et un temps d'acquisition de 60 s. En comparant leurs moyennes, il a été conclu qu'il n'y a pas de différence significative pour l'intensité moyenne, donc que le débit de la solution n'a pas d'effet sur l'intensité du signal observé par SERS.

La réponse suivant un changement rapide de la concentration a ensuite été déterminée en faisant circuler une solution de citrate de sodium 5 mM à un débit de $Q_2 = 0,5\text{ mL/h}$ à 0 mL/h tout en augmentant le débit d'eau de $Q_1 = 0\text{ mL/h}$ à $0,5\text{ mL/h}$. Tel qu'on peut observer à la Figure 7-7, le changement de l'intensité dans le temps indique une diminution rapide de l'intensité à la suite du changement de

concentration. La diminution lente au début peut être attribuée à l'écoulement résiduel dans le système à la suite du changement des débits des pompes à seringue. Pour les expériences subséquentes, il faut donc attendre au minimum trois minutes suivant un changement de concentration de l'analyte afin que le système soit bien stable. Ce délai pourrait être réduit en utilisant des tubes plus courts pour relier les seringues au dispositif microfluidique. Le remplacement des seringues en plastique par des seringues en verre pourrait aussi réduire le délai puisque ces dernières ont moins de friction entre le piston et le corps. Cela est dû au joint du piston en caoutchouc des seringues en plastique.

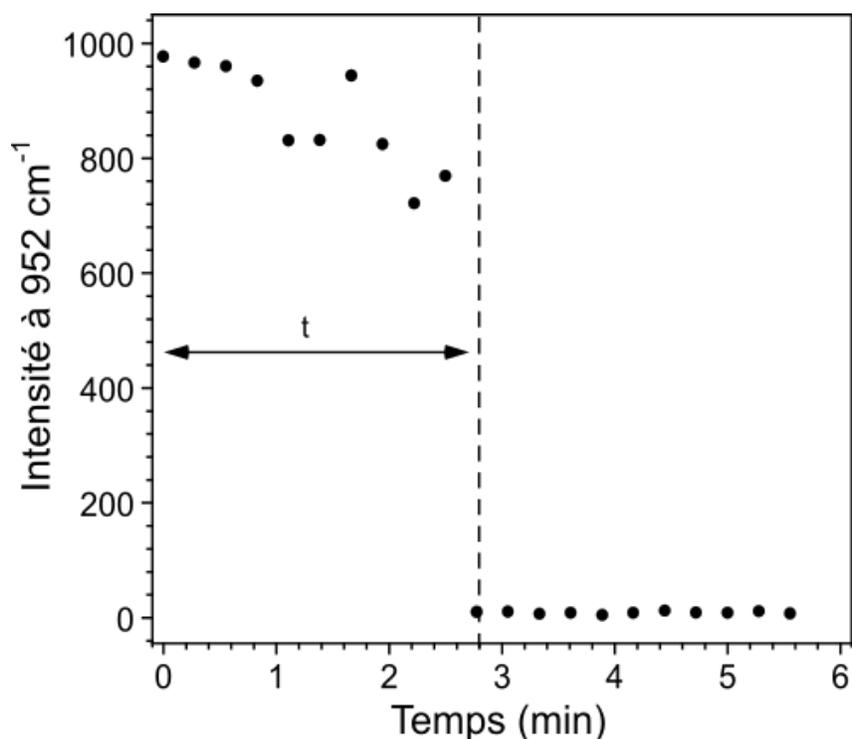


Figure 7-7 : Changement d'intensité de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ en Raman pour une solution 5 mM de citrate de sodium après avoir été remplacée par de l'eau. Initialement, la solution de citrate de sodium circulait par l'entrée 2 à 0,5 mL/h. Le débit à l'entrée 2 a été diminué à 0 mL/h tout en augmentant le débit d'eau dans l'entrée 1 à 0,5 mL/h. Les spectres ont été acquis en continu chaque 15 s avec un laser à 514,5 nm à une puissance de 10 mW. Le temps t , correspondant à près de trois minutes sur la figure indique le temps nécessaire pour que le système réponde.

7.4 Imagerie spectrale du citrate de sodium dans le microcanal

La concentration et la répartition de l'écoulement d'une solution de citrate de sodium 5 mM ont été observés par SERS en mode d'imagerie dans la section transversale du microcanal. Afin de valider les résultats, la microscopie optique a été utilisée pour observer un écoulement de solutions colorées dans les mêmes conditions. La Figure 7-8 A montre une micrographie d'une solution de citrate de sodium à un débit $Q_2 = 0,15$ mL/h circulant sur la surface active SERS et émergeant de la jonction entre les deux niveaux du dispositif microfluidique. Le débit de la solution de confinement est de $Q_1 = 0,34$ mL/h. Afin de montrer la possibilité d'utiliser cette plateforme pour confiner la croissance d'un biofilm, un dispositif microfluidique a été inoculé avec des bactéries *Pseudomonas sp*, et cultivées avec milieu de culture AB confiné dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la Figure 7-8 A. La Figure 7-8 B montre la micrographie d'un biofilm confiné par l'écoulement 48h après l'inoculation.

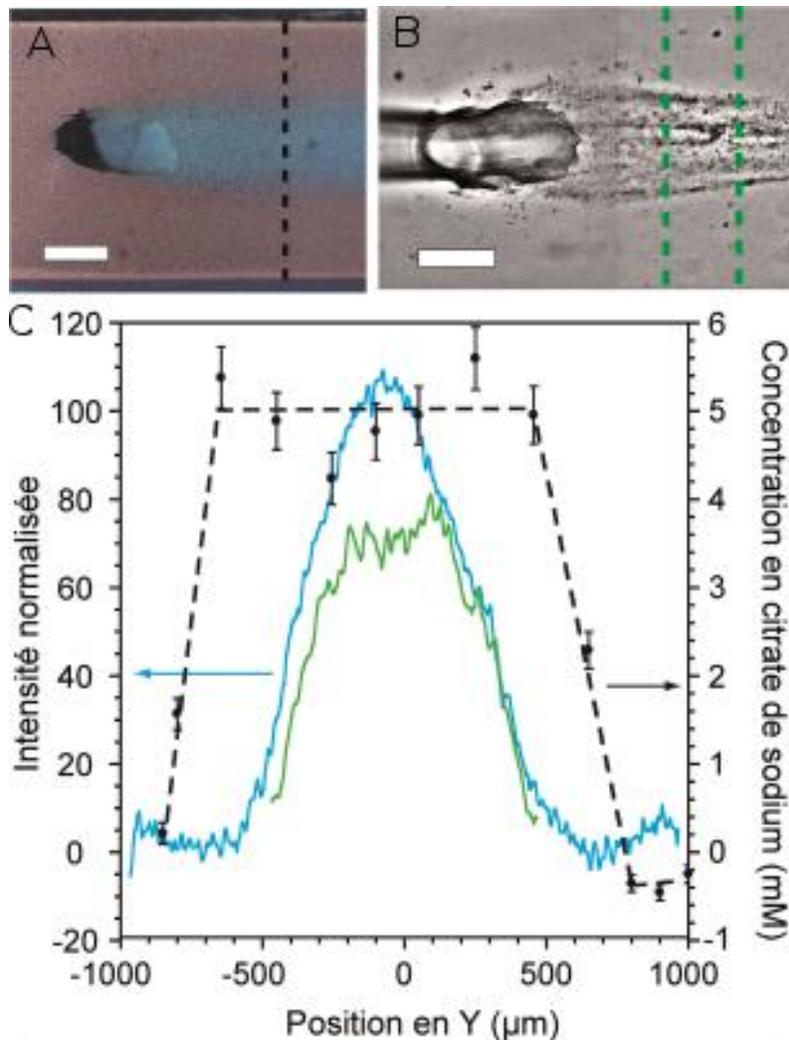


Figure 7-8 : A) Micrographie du microcanal à la jonction entre les solutions d'eau (rouge) et citrate de sodium 5 mM (bleu) avec des débits de 0,34 et 0,15 mL/h, respectivement. B) Micrographie du biofilm de *Pseudomonas sp* CT07 confiné par l'écoulement après 48 h de croissance à 22 °C. C) Mesures de densité optique et SERS dans la section transversale de la solution de citrate de sodium et d'un biofilm confiné. Le profil de concentration du citrate de sodium (points noirs) a été mesurée sur la ligne noire indiquée en A). La concentration en citrate de sodium a été mesurée à partir de l'intensité normalisée de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ (952 cm^{-1}) et de la courbe de calibration déterminée précédemment (Figure 7-7 B). Les barres d'erreur proviennent de l'incertitude de la régression linéaire de la courbe de calibration. La ligne pointillée noire est utilisée en tant que repère visuel. Le profil par microscopie optique de la solution confinée dans la section transversale a été mesuré en déterminant les valeurs de pixel du canal bleu de la caméra qui correspondent à la solution bleue à différentes positions dans le microcanal et en calculant la moyenne (ligne bleue). La densité optique dans la section transversale du biofilm confiné (ligne verte) a été mesurée à partir de micrographies acquises entre 48 et 56 heures après l'inoculation. Les barres d'échelles mesurent 500 μm.

Le profil de la solution de citrate de sodium et du biofilm confiné dans la section transversale des Figure 7-8 A et B a été mesuré quantitativement par microscopie optique et en SERS. Ces résultats se retrouvent à la Figure 7-8 C. Pour les mesures SERS, aucun colorant n'a été utilisé afin d'éviter la fluorescence et la présence de bandes vibrationnelles supplémentaires. À proximité des murs du microcanal, les concentrations mesurées étaient de zéro, ce qui indique la présence de la solution d'eau utilisé pour le confinement. Un peu plus loin des murs, la concentration augmente rapidement jusqu'à ce qu'elle forme un plateau à 5 mM tel qu'attendu. La largeur de ce plateau est d'environ 1100 μm . L'efficacité de l'effet SERS diminue rapidement pour les distances plus grandes que 3 nm à partir de la surface. Par conséquent, le plateau représente la largeur de l'écoulement de citrate de sodium au fond du canal. Afin de valider les résultats obtenus, des mesures de densité optique ont été faites à partir de micrographies en microscopie optique dans la même région que les mesures SERS. Le profil dans la section transversale de ces mesures forme une courbe en forme de cloche (Figure 7-8 C). La différence entre les formes des courbes obtenues à partir des deux méthodes provient principalement du fait que les mesures par microscopie optique proviennent la densité optique dans tout le parcours optique alors que les mesures SERS représentent la concentration sur la surface. Le flux de citrate de sodium est plus large à la base puisqu'il émerge à partir du fond du canal. Par conséquent, l'endroit où la densité optique commence à augmenter correspond à la jonction entre les deux solutions. La largeur à la base pour la courbe de densité optique est de 1150 μm , ce qui correspond bien aux mesures SERS.

La densité optique du biofilm confiné est représentée à la Figure 7-8 C. La croissance du biofilm est confinée au centre du canal, là où la concentration en citrate de sodium est non-nulle. De plus, le profil de densité optique du biofilm correspond à celui de la solution colorée représentant le citrate de sodium. Cela indique que la hauteur de la solution de nutriment confinée a un impact sur la croissance du biofilm. Cette approche pourrait être utilisée dans le futur afin d'obtenir

davantage d'informations pour les études en microfluidique de la croissance des biofilms.

La concentration en citrate de sodium mesurée en SERS indique qu'il y a un gradient de concentration entre les solutions contenant 5 mM et 0 mM de citrate de sodium. Cela provient de la diffusion des molécules de citrate de sodium près de la surface active en SERS entre les deux solutions. Des expériences futures sont prévues afin de corrélérer ces gradients de concentration à la diffusion du citrate de sodium sur la surface active SERS.

7.5 Conclusion

Un dispositif microfluidique avec une surface plasmonique active en SERS a été démontrée comme étant efficace pour l'imagerie spectrale et optique d'un biofilm et de son milieu de culture. La surface active SERS a été formée en utilisant des équipements facilement disponibles pour différents groupes de recherche. Cette technique est applicable pour des canaux de géométrie complexe et n'est pas limitée à certains matériaux particuliers. L'augmentation de la sensibilité grâce au SERS permet de mesurer des concentrations en dessous du millimolaire, de faire des acquisitions rapides et de travailler avec une puissance de laser faible. L'architecture du canal à deux niveaux permet d'avoir un confinement de la solution de citrate de sodium sur la surface plasmonique, permettant ainsi l'imagerie optique et SERS. Les résultats de profil d'écoulement en microscopie optique et en SERS sont complémentaires. Il a aussi été possible de confiner la croissance d'un biofilm dans le microcanal. Différentes optimisations doivent être explorées comme les conditions pour le traitement plasmonique de la surface active SERS et l'utilisation d'un laser avec une longueur d'onde plus près du maximum d'absorption plasmonique de la surface métallique. Le dispositif microfluidique et la méthodologie développée permettront de faire de l'imagerie spectrale de biofilms et de leur environnement chimique dans différentes conditions hydrodynamiques.

Conclusions et perspectives

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse portent sur les méthodes avancées pour l'étude des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 en microfluidique. Les biofilms formés par les bactéries de la famille *Pseudomonas* sont vastement étudiés dans la littérature puisque plusieurs d'entre eux posent de risques importants pour la santé. De manière plus générale, les biofilms peuvent être utilisés dans l'industrie de manière bénéfique, mais posent aussi beaucoup de problèmes. Par exemple, le bioencrassement de systèmes de filtres et des coques de bateau augmentent leurs coûts d'entretien et de fonctionnement.

La microfluidique comporte plusieurs avantages pour l'étude des systèmes complexes tels que les biofilms puisqu'elle permet le contrôle précis des forces de cisaillement dans le microcanal. Combiné avec différentes techniques de microscopie et spectroscopie, on peut obtenir des informations importantes concernant la structure et la composition des biofilms pendant leur croissance et les facteurs qui les influencent.

Le quatrième chapitre de cette thèse porte sur l'utilisation de la spectroscopie infrarouge et de la microscopie confocale pour l'étude des premières étapes de croissance des biofilms ainsi que des méthodes d'inoculation. Un montage pour les mesures par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée permettant l'acquisition des spectres directement dans un microcanal a été conçu. Nous avons ainsi pu suivre la concentration des protéines et des acides nucléiques directement au fond du microcanal pendant la croissance du biofilm. Une phase de latence est d'abord observée, puis il y a une croissance rapide où les bandes de tous les composés augmentent fortement en intensité. Cela est suivi d'une décroissance de l'intensité de la concentration en protéines et en acides nucléiques. Le ratio des bandes de ces deux composés indique qu'à ce moment, la concentration en protéines augmente par rapport à celle d'acides nucléiques. Cela nous a amené à

formuler l'hypothèse qu'il y a un réarrangement dans le biofilm à cette étape. Les mesures en microscopie confocale permettent de corroborer cette information. La haute résolution dans le plan XY et la possibilité de résoudre plusieurs plans entre eux dans la profondeur du biofilm a permis de suivre les bactéries dans le biofilm en trois dimensions. Une augmentation du pourcentage de l'aire couverte par les bactéries est d'abord observée pendant la phase de croissance rapide et elle est suivie par une diminution. L'aire couverte par le biofilm décroît de manière plus marquée dans les couches inférieures ce qui confirme qu'on a un réarrangement. Les informations combinées des deux techniques a aussi permis de tester l'impact de deux méthodes d'inoculation sur la période de latence du biofilm. Nous avons conclu que l'inoculation par un biofilm en amont permet d'obtenir un biofilm plus rapidement et de manière plus reproductible que l'inoculation directe.

Le cinquième chapitre porte sur l'effet des dimensions et des coins du microcanal sur la croissance. La microscopie en champ clair a permis de suivre l'augmentation de la biomasse à plusieurs positions dans le microcanal. Les biofilms ont une croissance plus rapide à proximité des murs de côté qu'au centre. Pour des forces de cisaillement moyennes identiques, le taux de croissance est plus important au niveau des murs pour un microcanal de hauteur plus grande. Cet effet est probablement relié à la disponibilité des nutriments pour le biofilm. Afin de tirer plus d'informations sur ce qui se produit aux coins du microcanal, nous avons fait des mesures en microscopie confocale. Ces mesures ont révélé la présence d'un canal à l'intérieur du biofilm. Ce canal est complètement entouré de bactéries, mais son intérieur est seulement rempli d'eau. Il est à proximité du mur de côté du microcanal et est parallèle à ce dernier. La formation d'un canal à l'intérieur du biofilm favorise vraisemblablement le transport des nutriments et l'élimination des déchets en permettant l'écoulement de liquide.

Le sixième chapitre porte sur l'impact d'un milieu de culture complexe et d'un milieu minimal sur la structure des biofilms. Pour le milieu de culture complexe, nous avons observé la formation de *streamers*, des structures filamenteuses, directement au

fond du microcanal. La microscopie confocale a permis de décrire pour la première fois le développement des *streamers* par le détachement partiel et soudain en trois dimensions. Pour le milieu de culture minimal, nous avons observé un modelage de surface par le biofilm. Les structures formées sont régulières, relativement compactes et elles se développent après la phase de croissance rapide.

Finalement le septième chapitre porte sur la conception d'un dispositif microfluidique pour l'étude *in situ* par spectroscopie Raman exaltée par les plasmons de surface (SERS). Cette technique de spectroscopie vibrationnelle permet d'augmenter de plusieurs ordres de magnitude le signal Raman pour plusieurs molécules. La surface active en SERS a été formée par déposition autocatalytique d'argent directement dans le microcanal suivi d'une augmentation de la rugosité par le traitement avec un plasma d'air. Ce système a été testé avec une solution de citrate de sodium qui est la source de carbone pour le milieu de culture AB que nous avons utilisé pour une partie des travaux dans le cadre de cette thèse. Nous avons évalué que l'augmentation du signal Raman par la surface SERS est 2×10^4 . Le dispositif que nous avons conçu permet de faire co-circuler un écoulement de citrate de sodium au centre du microcanal et un écoulement d'eau sur les côtés. Nous avons pu voir la transition entre ces deux écoulements directement au fond du microcanal par cette méthode.

Perspectives

Les travaux réalisés ouvrent la voie à plusieurs études poussées sur les biofilms. La méthode utilisée pour faire l'inoculation en amont des biofilms pourrait être étudiée davantage afin de mieux comprendre l'impact d'un biofilm sur la formation d'autres biofilms sur des surfaces situées en amont. Cela est important puisque dans les systèmes observés dans la nature, les biofilms sont fréquemment formés par les bactéries rejetées par d'autres biofilms.

Les différents facteurs influençant la structure des biofilms devront être étudiés plus en détail dans le futur. Plus particulièrement, l'effet de la forme des microcanaux, les forces de cisaillement et de la composition du milieu de culture pourrait être suivi à l'aide des méthodes en spectroscopie infrarouge, microscopie confocale et microscopie en champ clair. La restructuration du biofilm après la phase de croissance rapide et la formation d'un canal à l'intérieur du biofilm méritent des observations plus poussées. De plus, la formation des *streamers* dans le milieu de culture complexe pourrait être suivie dans différentes conditions. L'utilisation de marqueurs fluorescents ciblant spécifiquement la matrice extracellulaire serait intéressante pour voir comment elle est répartie par rapport aux bactéries dans le biofilm afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur les différentes structures que nous avons observées.

Bibliographie

1. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, et P. Stoodley, *Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(2): p. 95-108.
2. Flemming, H.-C., *The perfect slime*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **86**(2): p. 251-259.
3. Flemming, H.-C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S.A. Rice, et S. Kjelleberg, *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. Nature Reviews Microbiology, 2016. **14**: p. 563.
4. Papenfort, K. et B.L. Bassler, *Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2016. **14**: p. 576.
5. Petrova, O.E. et K. Sauer, *Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion*. Current Opinion in Microbiology, 2016. **30**: p. 67-78.
6. Brito, A.G. et L.F. Melo, *Mass transfer coefficients within anaerobic biofilms: effects of external liquid velocity*. Water Research, 1999. **33**(17): p. 3673-3678.
7. De Beer, D., P. Stoodley, et Z. Lewandowski, *Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms*. Water Research, 1996. **30**(11): p. 2761-2765.
8. Bester, E., G.M. Wolfaardt, N.B. Aznaveh, et J. Greener, *Biofilms' role in planktonic cell proliferation*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(11): p. 21965-21982.
9. Wilking, J.N., V. Zaburdaev, M. De Volder, R. Losick, M.P. Brenner, et D.A. Weitz, *Liquid transport facilitated by channels in Bacillus subtilis biofilms*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(3): p. 848-852.
10. Drescher, K., Y. Shen, B.L. Bassler, et H.A. Stone, *Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(11): p. 4345-50.
11. Hall-Stoodley, L., P. Stoodley, S. Kathju, N. Høiby, C. Moser, J. William Costerton, A. Moter, et T. Bjarnsholt, *Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2012. **65**(2): p. 127-145.
12. Kip, N. et J.A. van Veen, *The dual role of microbes in corrosion*. ISME J, 2015. **9**(3): p. 542-551.
13. Beech, I.B. et J. Sunner, *Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**(3): p. 181-186.
14. Nguyen, T., F.A. Roddick, et L. Fan, *Biofouling of water treatment membranes: A review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures*. Membranes, 2012. **2**(4): p. 804-840.

15. Brooks, J.D. et S.H. Flint, *Biofilms in the food industry: problems and potential solutions*. International Journal of Food Science & Technology, 2008. **43**(12): p. 2163-2176.
16. Dobretsov, S., R.M.M. Abed, et M. Teplitski, *Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms*. Biofouling, 2013. **29**(4): p. 423-441.
17. Bryers, J.D., *Medical biofilms*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. **100**(1): p. 1-18.
18. Lebeaux, D., J.-M. Ghigo, et C. Beloin, *Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014. **78**(3): p. 510-543.
19. Marrie, T.J., J. Nelligan, et J.W. Costerton, *A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1339-1341.
20. Rybtke, M., L.D. Hultqvist, M. Givskov, et T. Tolker-Nielsen, *Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: Community structure, antimicrobial tolerance and immune response*. Journal of Molecular Biology, 2015. **427**(23): p. 3628-3645.
21. Maunders, E. et M. Welch, *Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation*. Fems Microbiology Letters, 2017. **364**(13).
22. Jennings, L.K., K.M. Storek, H.E. Ledvina, C. Coulon, L.S. Marmont, I. Sadovskaya, P.R. Secor, B.S. Tseng, M. Scian, A. Filloux, D.J. Wozniak, P.L. Howell, et M.R. Parsek, *Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(36): p. 11353-11358.
23. Shaw, T., M. Winston, C.J. Rupp, I. Klapper, et P. Stoodley, *Commonality of elastic relaxation times in biofilms*. Physical Review Letters, 2004. **93**(9): p. 098102.
24. Chen, X. et P.S. Stewart, *Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **59**(6): p. 718-720.
25. Pavlovsky, L., J.G. Younger, et M.J. Solomon, *In situ rheology of Staphylococcus epidermidis bacterial biofilms*. Soft Matter, 2013. **9**(1): p. 122-131.
26. Paquet-Mercier, F., M. Parvinzadeh Gashti, J. Bellavance, S.M. Taghavi, et J. Greener, *Through thick and thin: a microfluidic approach for continuous measurements of biofilm viscosity*. Lab on a Chip, 2016.
27. Zhang, W., J. Sun, W. Ding, J. Lin, R. Tian, L. Lu, X. Liu, X. Shen, et P.-Y. Qian, *Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015. **5**: p. 40.
28. Sauer, K., A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, et D.G. Davies, *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(4): p. 1140-1154.

29. Jucker, B.A., H. Harms, et A.J. Zehnder, *Adhesion of the positively charged bacterium Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia 70401 to glass and Teflon*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**(18): p. 5472-5479.
30. Flemming, H.-C. et J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**: p. 623.
31. Delille, A., F. Quiles, et F. Humbert, *In situ monitoring of the nascent Pseudomonas fluorescens Biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(18): p. 5782-5788.
32. Quiles, F., F. Humbert, et A. Delille, *Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of Pseudomonas fluorescens from planktonic state to nascent biofilm state*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **75**(2): p. 610-616.
33. De Kievit, T.R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, et B.H. Iglewski, *Quorum-sensing genes in Pseudomonas aeruginosa biofilms: Their role and expression patterns*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(4): p. 1865-1873.
34. Kirisits, M.J., J.J. Margolis, B.L. Purevdorj-Gage, B. Vaughan, D.L. Chopp, P. Stoodley, et M.R. Parsek, *Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Journal of Bacteriology, 2007. **189**(22): p. 8357-8360.
35. Magariyama, Y., M. Ichiba, K. Nakata, K. Baba, T. Ohtani, S. Kudo, et T. Goto, *Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect*. Biophysical Journal, 2005. **88**(5): p. 3648-3658.
36. Kurtuldu, H., J.S. Guasto, K.A. Johnson, et J.P. Gollub, *Enhancement of biomixing by swimming algal cells in two-dimensional films*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(26): p. 10391-10395.
37. Stewart, P.S., *Diffusion in biofilms*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(5): p. 1485-1491.
38. von Ohle, C., A. Gieseke, L. Nistico, E.M. Decker, D. deBeer, et P. Stoodley, *Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(7): p. 2326-2334.
39. Kragh, K.N., J.B. Hutchison, G. Melaugh, C. Rodesney, A.E.L. Roberts, Y. Irie, P.Ø. Jensen, S.P. Diggle, R.J. Allen, V. Gordon, et T. Bjarnsholt, *Role of multicellular aggregates in biofilm formation*. mBio, 2016. **7**(2).
40. Eberl, H.J., C. Picioreanu, J.J. Heijnen, et M.C.M. van Loosdrecht, *A three-dimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms*. Chemical Engineering Science, 2000. **55**(24): p. 6209-6222.
41. Houry, A., M. Gohar, J. Deschamps, E. Tischenko, S. Aymerich, A. Gruss, et R. Briandet, *Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(32): p. 13088-13093.

42. Stoodley, P., D. deBeer, et Z. Lewandowski, *Liquid flow in biofilm systems*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(8): p. 2711-2716.
43. Stoodley, P., S.N. Yang, H. LappinScott, et Z. Lewandowski, *Relationship between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogenous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy*. Biotechnology and Bioengineering, 1997. **56**(6): p. 681-688.
44. Blair, J.M.A., M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, et L.J.V. Piddock, *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nature Reviews Microbiology, 2014. **13**: p. 42.
45. Tang, W.-W., G.-M. Zeng, J.-L. Gong, J. Liang, P. Xu, C. Zhang, et B.-B. Huang, *Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review*. Science of The Total Environment, 2014. **468-469**: p. 1014-1027.
46. Peulen, T.-O. et K.J. Wilkinson, *Diffusion of nanoparticles in a biofilm*. Environmental Science & Technology, 2011. **45**(8): p. 3367-3373.
47. Cruz, K., J. Guezennec, et T. Barkay, *Binding of Hg by bacterial extracellular polysaccharide: a possible role in Hg tolerance*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017. **101**(13): p. 5493-5503.
48. Singh, R., D. Paul, et R.K. Jain, *Biofilms: implications in bioremediation*. Trends in Microbiology, 2006. **14**(9): p. 389-397.
49. Costley, S.C. et F.M. Wallis, *Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor*. Water Research, 2001. **35**(15): p. 3715-3723.
50. Nickels, J.D., J. Atkinson, E. Papp-Szabo, C. Stanley, S.O. Diallo, S. Perticaroli, B. Baylis, P. Mahon, G. Ehlers, J. Katsaras, et J.R. Dutcher, *Structure and hydration of highly-branched, monodisperse phytoglycogen nanoparticles*. Biomacromolecules, 2016. **17**(3): p. 735-743.
51. Pereira, M.O., M. Kuehn, S. Wuertz, T. Neu, et L.F. Melo, *Effect of flow regime on the architecture of a Pseudomonas fluorescens biofilm*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. **78**(2): p. 164-171.
52. Zarabadi, M.P., F. Paquet-Mercier, S.J. Charette, et J. Greener, *Hydrodynamic effects on biofilms at the biointerface using a microfluidic electrochemical cell: Case study of Pseudomonas sp.* Langmuir, 2017. **33**(8): p. 2041-2049.
53. Gutiérrez, D., C. Hidalgo-Cantabrana, A. Rodríguez, P. García, et P. Ruas-Madiedo, *Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology*. PLoS ONE, 2016. **11**(10): p. e0163966.
54. Salek, M.M., S.M. Jones, et R.J. Martinuzzi, *The influence of flow cell geometry related shear stresses on the distribution, structure and susceptibility of Pseudomonas aeruginosa 01 biofilms*. Biofouling, 2009. **25**(8): p. 711-725.
55. Karimi, A., D. Karig, A. Kumar, et A.M. Ardekani, *Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods*. Lab on a Chip, 2015. **15**(1): p. 23-42.

56. Voicu, D., C. Scholl, W. Li, D. Jagadeesan, I. Nasimova, J. Greener, et E. Kumacheva, *Kinetics of multicomponent polymerization reaction studied in a microfluidic format*. *Macromolecules*, 2012. **45**(11): p. 4469-4475.
57. Hoffman, M.D., L.I. Zucker, P.J.B. Brown, D.T. Kysela, Y.V. Brun, et S.C. Jacobson, *Timescales and frequencies of reversible and irreversible adhesion events of single bacterial cells*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(24): p. 12032-12039.
58. Proft, T. et E.N. Baker, *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. **66**(4): p. 613.
59. Kim, J., H.S. Kim, S. Han, J.Y. Lee, J.E. Oh, S. Chung, et H.D. Park, *Hydrodynamic effects on bacterial biofilm development in a microfluidic environment*. *Lab on a Chip*, 2013. **13**(10): p. 1846-1849.
60. Valiei, A., A. Kumar, P.P. Mukherjee, Y. Liu, et T. Thundat, *A web of streamers: biofilm formation in a porous microfluidic device*. *Lab on a Chip*, 2012. **12**(24): p. 5133-5137.
61. Rusconi, R., S. Lecuyer, L. Guglielmini, et H.A. Stone, *Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers*. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010. **7**(50): p. 1293-1299.
62. Gashti, M.P., J. Bellavance, O. Kroukamp, G. Wolfaardt, S.M. Taghavi, et J. Greener, *Live-streaming: Time-lapse video evidence of novel streamer formation mechanism and varying viscosity*. *Biomicrofluidics*, 2015. **9**(4).
63. Cabrera, C.R., B. Finlayson, et P. Yager, *Formation of natural pH gradients in a microfluidic device under flow conditions: Model and experimental validation*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(3): p. 658-666.
64. Greener, J., E. Tumarkin, M. Debono, C.H. Kwan, M. Abolhasani, A. Guenther, et E. Kumacheva, *Development and applications of a microfluidic reactor with multiple analytical probes*. *Analyst*, 2012. **137**(2): p. 444-450.
65. Ryu, G., J.S. Huang, O. Hofmann, C.A. Walshe, J.Y.Y. Sze, G.D. McClean, A. Mosley, S.J. Rattle, J.C. deMello, A.J. deMello, et D.D.C. Bradley, *Highly sensitive fluorescence detection system for microfluidic lab-on-a-chip*. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(9): p. 1664-1670.
66. Pink, J., T. Smith-Palmer, D. Chisholm, T.J. Beveridge, et D.A. Pink, *An FTIR study of Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm development: interpretation of ATR-FTIR data in the 1500–1180 cm⁻¹ region*. *Biofilms*, 2005. **2**(03): p. 165-175.
67. Bakke, R., R. Kommedal, et S. Kalvenes, *Quantification of biofilm accumulation by an optical approach*. *Journal of Microbiological Methods*, 2001. **44**(1): p. 13-26.
68. Allison, D.G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe, et P. Gilbert, *Extracellular products as mediators of the formation and detachment of Pseudomonas fluorescens biofilms*. *Fems Microbiology Letters*, 1998. **167**(2): p. 179-184.
69. Parvinzadeh Gashti, M., M.P. Zarabadi, et J. Greener, *A video imaging method for time-dependent measurements of molecular mass transfer and biofilm dynamics in microchannels*. *MRS Advances*, 2016. p. 1-8.

70. Wolfaardt, G.M., M.J. Hendry, T. Birkham, A. Bressel, M.N. Gardner, A.J. Sousa, D.R. Korber, et M. Pilaski, *Microbial response to environmental gradients in a ceramic-based diffusion system*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. **100**(1): p. 141-149.
71. Schlafer, S. et R.L. Meyer, *Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix*. Journal of Microbiological Methods, 2017. **138**: p. 50-59.
72. Shimomura, O., F.H. Johnson, et Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1962. **59**(3): p. 223-239.
73. Remington, S.J., *Green fluorescent protein: A perspective*. Protein Science : A Publication of the Protein Society, 2011. **20**(9): p. 1509-1519.
74. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, et D. Prasher, *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
75. Sommer, R., S. Wagner, K. Rox, A. Varrot, D. Hauck, E.-C. Wamhoff, J. Schreiber, T. Ryckmans, T. Brunner, C. Rademacher, R.W. Hartmann, M. Brönstrup, A. Imberty, et A. Titz, *Glycomimetic, orally bioavailable LecB inhibitors block biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Chemical Society, 2017.
76. Lawrence, J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, et D.E. Caldwell, *Optical sectioning of microbial biofilms*. Journal of Bacteriology, 1991. **173**(20): p. 6558-6567.
77. Lappin-Scott, H.M. et J.W. Costerton, *Microbial biofilms*. 1st pbk. ed ed2003, Cambridge: Cambridge University Press. xiii, 310 p.
78. Kim, M.K., K. Drescher, O.S. Pak, B.L. Bassler, et H.A. Stone, *Filaments in curved streamlines: rapid formation of Staphylococcus aureus biofilm streamers*. New Journal of Physics, 2014. **16**.
79. Peulen, T.O. et K.J. Wilkinson, *Diffusion of nanoparticles in a biofilm*. Environmental Science & Technology, 2011. **45**(8): p. 3367-3373.
80. Holman, H.Y.N., R. Miles, Z. Hao, E. Wozel, L.M. Anderson, et H. Yang, *Real-time chemical imaging of bacterial activity in biofilms using open-channel microfluidics and synchrotron FTIR spectromicroscopy*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(20): p. 8564-8570.
81. Stiles, P.L., J.A. Dieringer, N.C. Shah, et R.R. Van Duyne, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*, in *Annual Review of Analytical Chemistry* 2008, Annual Reviews: Palo Alto, CA, USA. p. 601-626.
82. Haynes, C.L., A.D. McFarland, et R.P.V. Duyne, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(17): p. 338 A-346 A.
83. Hao, E. et G.C. Schatz, *Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers*. Journal of Chemical Physics, 2004. **120**(1): p. 357-366.
84. Delhaye, C., J.L. Bruneel, D. Talaga, M. Guirardel, S. Lecomte, et L. Servant, *Tailoring surface-enhanced Raman scattering effect using microfluidics*. Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(9): p. 5327-5332.

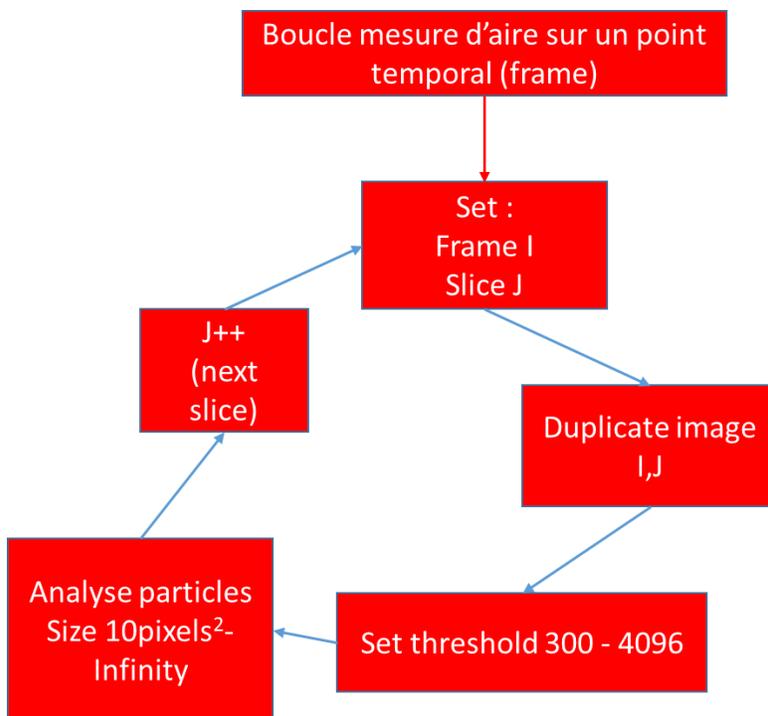
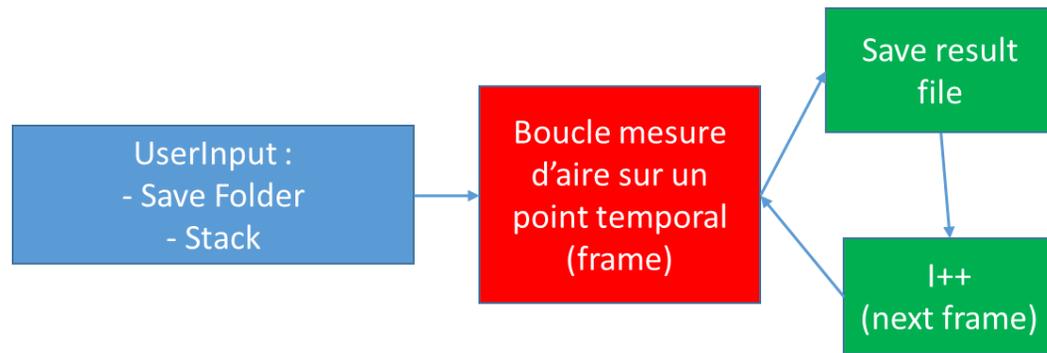
85. Lu, X.N., D.R. Samuelson, Y.H. Xu, H.W. Zhang, S. Wang, B.A. Rasco, J. Xu, et M.E. Konkel, *Detecting and tracking nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus using a microfluidic SERS biosensor*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(4): p. 2320-2327.
86. Park, T., S. Lee, G.H. Seong, J. Choo, E.K. Lee, Y.S. Kim, W.H. Ji, S.Y. Hwang, et D.G. Gweon, *Highly sensitive signal detection of duplex dye-labelled DNA oligonucleotides in a PDMS microfluidic chip: confocal surface-enhanced Raman spectroscopic study*. Lab on a Chip, 2005. **5**(4): p. 437-442.
87. Taylor, L.C., T.B. Kirchner, N.V. Lavrik, et M.J. Sepaniak, *Surface enhanced Raman spectroscopy for microfluidic pillar arrayed separation chips*. Analyst, 2012. **137**(4): p. 1005-1012.
88. Xu, B.-B., Z.-C. Ma, L. Wang, R. Zhang, L.-G. Niu, Z. Yang, Y.-L. Zhang, W.-H. Zheng, B. Zhao, Y. Xu, Q.-D. Chen, H. Xia, et H.-B. Sun, *Localized flexible integration of high-efficiency surface enhanced Raman scattering (SERS) monitors into microfluidic channels*. Lab on a Chip, 2011. **11**(19): p. 3347-3351.
89. Xu, B.-B., R. Zhang, X.-Q. Liu, H. Wang, Y.-L. Zhang, H.-B. Jiang, L. Wang, Z.-C. Ma, J.-F. Ku, F.-S. Xiao, et H.-B. Sun, *On-chip fabrication of silver microflower arrays as a catalytic microreactor for allowing in situ SERS monitoring*. Chemical Communications, 2012. **48**(11): p. 1680-1682.
90. Huttner, W., K. Christou, A. Gohmann, V. Beushausen, et H. Wackerbarth, *Implementation of substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy for continuous analysis in an optofluidic device*. Microfluidics and Nanofluidics, 2012. **12**(1-4): p. 521-527.
91. Xu, B.-B., Z.-C. Ma, H. Wang, X.-Q. Liu, Y.-L. Zhang, X.-L. Zhang, R. Zhang, H.-B. Jiang, et H.-B. Sun, *A SERS-active microfluidic device with tunable surface plasmon resonances*. Electrophoresis, 2011. **32**(23): p. 3378-3384.
92. Liu, G.L. et L.P. Lee, *Nanowell surface enhanced Raman scattering arrays fabricated by soft-lithography for label-free biomolecular detections in integrated microfluidics*. Applied Physics Letters, 2005. **87**(7): p. 074101-3.
93. Kho, K.W., K.Z.M. Qing, Z.X. Shen, I.B. Ahmad, F. Watt, K.C. Soo, M. Olivo, S.S.C. Lim, S. Mhaisalkar, et T.J. White, *Polymer-based microfluidics with surface-enhanced Raman-spectroscopy-active periodic metal nanostructures for biofluid analysis*. Journal of Biomedical Optics, 2008. **13**(5): p. 054026-054026.
94. Connatser, R.M., M. Cochran, R.J. Harrison, et M.J. Sepaniak, *Analytical optimization of nanocomposite surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering detection in microfluidic separation devices*. Electrophoresis, 2008. **29**(7): p. 1441-1450.
95. Couture, M., T. Brulé, S. Laing, W. Cui, M. Sarkar, B. Charron, K. Faulds, W. Peng, M. Canva, et J.-F. Masson, *High figure of merit (FOM) of Bragg modes in Au-coated nanodisk arrays for plasmonic sensing*. Small, 2017. **13**(38): p. 1700908-n/a.

96. Ng, J.M.K., I. Gitlin, A.D. Stroock, et G.M. Whitesides, *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(20): p. 3461-3473.
97. Clark, D.J. et O. Maaløe, *DNA replication and the division cycle in Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1967. **23**(1): p. 99-112.
98. Bester, E., G. Wolfaardt, L. Joubert, K. Garny, et S. Saftic, *Planktonic-cell yield of a Pseudomonad biofilm*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(12): p. 7792-7798.
99. Rajmohan, S., C.E.R. Dodd, et W.M. Waites, *Enzymes from isolates of Pseudomonas fluorescens involved in food spoilage*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. **93**(2): p. 205-213.
100. Rollet, C., L. Gal, et J. Guzzo, *Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Microbiology Letters*, 2009. **290**(2): p. 135-142.
101. Kroukamp, O. et G.M. Wolfaardt, *CO₂ Production as an Indicator of Biofilm Metabolism*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. **75**(13): p. 4391-4397.
102. Schneider, C.A., W.S. Rasband, et K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
103. Hermanowicz, S.W., U. Schindler, et P. Wilderer, *Anisotropic morphology and fractal dimensions of biofilms*. *Water Research*, 1996. **30**(3): p. 753-755.
104. Jang, H.C., R. Rusconi, et R. Stocker, *Biofilm disruption by an air bubble reveals heterogeneous age-dependent detachment patterns dictated by initial extracellular matrix distribution*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2017. **3**.
105. Brust, M. et C.J. Kiely, *Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002. **202**(2-3): p. 175-186.
106. Schlesinger, M., *Electroless and Electrodeposition of Silver*, in *Modern Electroplating*, M. Schlesinger et M. Paunovic, Editors. 2010, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA. p. 131-138.
107. Kinnan, M.K., A. Kumbhar, et G. Chumanov, *Plasma reduction of silver compounds for fabrication of surface-enhanced Raman scattering substrates*. *Applied Spectroscopy*, 2008. **62**(7): p. 721-726.
108. Neu, T.R., G.D.W. Swerhone, et J.R. Lawrence, *Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems*. *Microbiology*, 2001. **147**(2): p. 299-313.
109. Sugimoto, S., K.-i. Okuda, R. Miyakawa, M. Sato, K.-i. Arita-Morioka, A. Chiba, K. Yamanaka, T. Ogura, Y. Mizunoe, et C. Sato, *Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 25889.
110. Kroukamp, O., R.G. Dumitrache, et G.M. Wolfaardt, *Pronounced Effect of the Nature of the Inoculum on Biofilm Development in Flow Systems*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010. **76**(18): p. 6025-6031.

111. Filip, Z. et S. Hermann, *An attempt to differentiate Pseudomonas spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy*. European Journal of Soil Biology, 2001. **37**(3): p. 137-143.
112. Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, et J.M. Ruysschaert, *Determination of soluble and membranes Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy I. Assignments and Model Coumpounds*, in *Physicochemical Methods in the study of Biomembranes*, H.J. Hilderson et G.R. Ralston, Editors. 1994, Plenum Press: New-York. p. 329-362.
113. White, J. et E. Stelzer, *Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(2): p. 61-65.
114. Greener, J., M.P. Gashti, A. Eslami, M.P. Zarabadi, et S.M. Taghavi, *A microfluidic method and custom model for continuous, non-intrusive biofilm viscosity measurements under different nutrient conditions*. Biomicrofluidics, 2016. **10**(6): p. 064107.
115. Park, A., H.-H. Jeong, J. Lee, K.P. Kim, et C.-S. Lee, *Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel*. Biochip Journal, 2011. **5**(3): p. 236.
116. Stoodley, P., K. Sauer, D.G. Davies, et J.W. Costerton, *Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Review of Microbiology, 2002. **56**(1): p. 187-209.
117. Davey, M.E., N.C. Caiazza, et G.A. O'Toole, *Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(3): p. 1027-1036.
118. Cunningham, A.B., W.G. Characklis, F. Abedeen, et D. Crawford, *Influence of biofilm accumulation on porous-media hydrodynamics*. Environmental Science & Technology, 1991. **25**(7): p. 1305-1311.
119. Stoodley, P., Z. Lewandowski, J.D. Boyle, et H.M. Lappin-Scott, *Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **65**(1): p. 83-92.
120. Stoodley, P., I. Dodds, J.D. Boyle, et H.M. Lappin-Scott, *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure*. Journal of Applied Microbiology, 1999. **85**: p. 19S-28S.
121. Xia, Y. et G.M. Whitesides, *Soft lithography*. Angewandte Chemie, International Edition, 1998. **37**(5): p. 550-575.
122. Greener, J., W. Li, J. Ren, D. Voicu, V. Pakhareenko, T. Tang, et E. Kumacheva, *Rapid, cost-efficient fabrication of microfluidic reactors in thermoplastic polymers by combining photolithography and hot embossing*. Lab on a Chip, 2010. **10**(4): p. 522-524.
123. Li, W., J. Greener, D. Voicu, et E. Kumacheva, *Multiple modular microfluidic (M-3) reactors for the synthesis of polymer particles*. Lab on a Chip, 2009. **9**(18): p. 2715-2721.
124. Greener, J., E. Tumarkin, M. Debono, A.P. Dicks, et E. Kumacheva, *Education: a microfluidic platform for university-level analytical chemistry laboratories*. Lab on a Chip, 2012. **12**(4): p. 696-701.

125. Lim, Y.C., A.Z. Kouzani, et W. Duan, *Lab-on-a-chip: a component view*. Microsystem Technologies, 2010. **16**(12): p. 1995-2015.
126. Meyer, M.T., V. Roy, W.E. Bentley, et R. Ghodssi, *Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2011. **21**(5): p. 054023.
127. Chen, L. et J. Choo, *Recent advances in surface-enhanced Raman scattering detection technology for microfluidic chips*. Electrophoresis, 2008. **29**(9): p. 1815-1828.
128. McLaughlin, C., D. MacMillan, C. McCardle, et W.E. Smith, *Quantitative analysis of mitoxantrone by surface-enhanced resonance Raman scattering*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(13): p. 3160-3167.
129. Strehle, K.R., D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, et J. Popp, *A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(4): p. 1542-1547.
130. Liu, Y.-C. et C.-C. Wang, *Effect of argon plasma treatment on surface-enhanced Raman spectroscopy of polypyrrole deposited on electrochemically roughened gold substrates*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(12): p. 5779-5782.
131. Li, Z.Y., W.M. Tong, W.F. Stickle, D.L. Neiman, R.S. Williams, L.L. Hunter, A.A. Talin, D. Li, et S.R.J. Brueck, *Plasma-induced formation of ag nanodots for ultra-high-enhancement surface-enhanced raman scattering substrates*. Langmuir, 2007. **23**(9): p. 5135-5138.
132. Wang, C.-C., *Surfaced-enhanced Raman scattering-active substrates prepared through a combination of argon plasma and electrochemical techniques*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(14): p. 5573-5578.
133. Wang, C.-C. et J.-S. Chen, *Improved surfaced-enhanced Raman scattering based on electrochemically roughened silver substrates modified through argon plasma treatment*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(18): p. 5615-5620.
134. Abu-Hatab, N.A., J.F. John, J.M. Oran, et M.J. Sepaniak, *Multiplexed microfluidic surface-enhanced Raman spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2007. **61**(10): p. 1116-1122.

Annexe I : Schéma représentant le processus de traitement automatisé de la mesure d'aire occupée par les bactéries à partir des résultats en CLSM



Annexe II : Macro ImageJ pour les mesures d'aire occupée par les bactéries

```
output = getDirectory("Output directory");
waitForUser("Open the stack you want to work with");
myStack = getTitle();
getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
inCount = 1;
```

```
for (i=1; i<frames+1; i++){
    bactAreaCLSM(inCount);
    inCount = inCount +1;
}
```

```
function bactAreaCLSM(inCount){

    getDimensions(width, height, channels, slices, frames);

    for (i=1; i <= slices; i++){
        Stack.setPosition(1, i, inCount);
        selectSlice();
    }

    selectWindow("Summary");

    saveAs(".txt", output + "result_" + inCount + "_area");
    selectWindow("result_" + inCount + "_area" + ".txt");
    run("Close");
}
```

//Move to the next Frame and keeps the last user setted Slice.

//We ask the user to go to the proper slice.

```
function selectSlice(){

    Stack.getPosition(curChannel, curSlice, myFrame);
    _curSlice = toString(curSlice);
    _curFrame = toString(myFrame);
    run("Duplicate...", " slices=" + _curSlice + " frames=" + _curFrame);
    rename("MFBF");
}
```

```
    curlmg = getTitle();
    measureArea();
    close("MFBF");
}

function measureArea(){
    setThreshold(350, 4096); //Change the threshold values if needed. use for
    auto thresholding
    run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity pixel summarize");
}
```

Annexe III : Macro ImageJ pour les mesures de dimension fractale

```
input = getDirectory("Input directory");
//output = getDirectory("Output directory");

Dialog.create("File type & plane spacing");
Dialog.addString("File suffix: ", ".oif", 5);
Dialog.addNumber("Number of slices in the stack", 40);
Dialog.addNumber("Number of slices to average", 4);
Dialog.addNumber("First slice to consider", 1);
Dialog.show();

suffix = Dialog.getString();
TotSlices = Dialog.getNumber();
AveSlices = Dialog.getNumber();
sl1 = Dialog.getNumber();

_numFrames = getFileList(input);
numFrames = _numFrames.length;
newImage("ResultsArray", "32-bit", numFrames, (TotSlices - sl1)/AveSlices, 1);
index = 0;

setBatchMode(true);

processFolder(input, index);

function processFolder(input, index) {
    list = getFileList(input);

    for (i = 0; i < list.length; i++) {
        //if(File.isDirectory(input + list[i]))

            //processFolder("" + input + list[i], index);
            //index += 1;
        if(endsWith(list[i], suffix)){
            CountFractal(input, list[i], index);
            index += 1;}
    }
}

function CountFractal(input, file, _index) {
```

```

run("Bio-Formats Importer", "open=" + input + file + " color_mode=Default
view=Hyperstack stack_order=XYCZT");
StackName = getTitle();

//Fractal box count analysis on each part of the stack.
for (i = 0; i < (TotSlices - sl1)/AveSlices; i++){

    //Make the Z projection of the slices to average. It makes a new
window for the result.
    selectWindow(StackName);
    run("Z Project...", "start=" + (i * AveSlices + sl1) + " stop=" + (i *
AveSlices + sl1 + AveSlices - 1) + " projection=[Average Intensity]");

    //Makes the Fractal Box count analysis on the projection.
    selectWindow("AVG_" + StackName);
    run("8-bit");
    setThreshold(25, 255);
    run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark");
    run("Fractal Box Count...", "box=2,3,4,6,8,12,16,32,64");
    close("Plot");

    //Puts the result into a 2D matrix (32-bit image).
    PixValue = getResult("D", i);
    selectWindow("ResultsArray");
    setPixel(_index , i , PixValue);
    close("AVG_" + StackName);
}

close(StackName);
run("Clear Results");
}

```