



HAL
open science

Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution

Anne Delille

► **To cite this version:**

Anne Delille. Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN10119 . tel-01748269

HAL Id: tel-01748269

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748269v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R. Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés
Ecole Doctorale SESAMES
Département de Formation Doctorale

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Chimie et Physico-Chimie Moléculaires

par

Anne DELILLE

Etude *in situ*, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution

Soutenue publiquement le 15 novembre 2007 devant la commission d'examen

Président du jury : M. J.C. BLOCK

Professeur, UHP Nancy I - LCPME, Villers-lès-Nancy

Rapporteurs : Mme M.N. BELLON-FONTAINE
M. O. SIRE

Directeur de Recherche, INRA, Massy
Professeur, UBS – L2PIC / DSI, Vannes

Examineurs : Mme C. COMPERE
M. F. HUMBERT
Mme F. MENARD-SZCZEBARA
Mme F. QUILES

Docteur, IFREMER, Brest
Professeur, UHP Nancy I – LCPME, Villers-lès-Nancy
Docteur, Anjou Recherche, Maisons-Laffitte
Chargée de Recherche, CNRS – LCPME, Villers-lès-Nancy

A mes parents,
A mon parrain,
A ma grand mère
A ma famille et amis

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Chimie et Spectrochimie des Interfaces au Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR CNRS 7564 / Université Henri Poincaré Nancy I).

Je tiens, tout d'abord, à remercier la Communauté européenne, pour m'avoir financée durant trois années, ainsi que les membres du comité de suivi du programme européen SAFER, et notamment le Pr. Jean Claude BLOCK et le Dr. Sylvain FASS, pour m'avoir accordé leur confiance pour ce projet. J'adresse également tous mes remerciements au Dr. Jean-Jacques EHRHARDT, Directeur de Recherches au CNRS, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour m'avoir accordé sa confiance.

Je remercie vivement le Pr. François HUMBERT, mon directeur de thèse, pour ses conseils, ses remarques et pour m'avoir confié des enseignements en Chimie Physique à des étudiants de l'ESSTIN. Cette expérience fut très enrichissante.

Je remercie aussi, le Dr. Fabienne QUILLES, qui a co-encadré mon travail de thèse : son expérience en IR-ATR m'a beaucoup aidée.

Je tiens à remercier le Dr. Manuel DOSSOT qui m'a beaucoup aidé, notamment à mettre en route ce long travail présenté dans ce mémoire. Nous avons réussi, avec la précieuse aide en microbiologie, d'Hélène GUILLOTEAU, à obtenir des résultats rapides et proches de ce que l'on espérait.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail et de se déplacer le jour de ma soutenance malgré les difficultés rencontrées ! Un grand merci à :

Mme Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, Professeur à l'INRA Massy et à l'ENSIA

Mme Chantal Compère, Docteur et Ingénieur de Recherches à l'IFREMER, Brest

Mme Florence MENARD-SZCZEBARA, Docteur et Chef de projet à ANJOU Recherches, VEOLIA

M Olivier SIRE, Professeur à l'Université de Bretagne Sud

Durant ces quatre années, j'ai souvent sollicité l'aide, ô combien précieuse et irremplaçable du Dr. Jérôme GRAUSEM, que ce soit en IR, en Raman et en informatique ! Je voudrais le remercier pour tout cela et également pour sa bonne humeur communicative.

J'ai également eu la chance de pouvoir réaliser des analyses XPS grâce au Dr. Jacques LAMBERT que je remercie tant pour le temps qu'il m'a consacré ainsi que pour ses interprétations.

Merci au Dr. Fabien GABORIAUD pour m'avoir permis de participer à l'Ecole thématique Interface microorganismes / solutions à Ramonchamp qui m'a permis de découvrir différentes approches de l'études des biofilms.

Je souhaite aussi ne pas oublier Jean-Paul MOULIN qui, grâce à sa bonne humeur et à son écoute, m'a remonté le moral bien des fois !

Merci également à Jean Paul et Gérard pour leurs réalisations artistiques et notamment pour le découpage du spectro Bruker !! (il s'en est remis heureusement) et pour toutes les cellules et pièces qui m'ont été nécessaires.

Je ne voudrais pas non plus oublier Pascal et Didier, ni même Christelle, Marie, Jacqueline, Patrick, Monique ainsi que toutes les personnes du Pôle de l'Eau avec qui j'ai passé de bons moments. Merci également à Jérôme CORTOT pour son aide.

Etant novice en microbiologie, j'ai, en plus de l'aide irremplaçable d'Hélène, pu bénéficier de conseils des partenaires européens impliqués dans le programme SAFER, et en particulier de Candida, Anna, Olga, Sandra, Simone et Gabriella. Je souhaite également adresser un grand merci à Pascale. Concernant les différentes réunions de travail auxquelles j'ai participé, cela m'a permis de rencontrer des chercheurs ayant des approches ou des points de vue différents ce qui m'a apporté une grande ouverture d'esprit. Un petit clin d'œil à Hans-Curt FLEMMING !

Je pense également aux anciens (Marie Camille, Emmanuel, Asfaw, Meng, Emilie, Fred, Hugues, Cyril, Stéphanie) thésards ainsi qu'aux futurs (Josiane, Lucie, Lydie) docteurs avec qui j'ai passé de bons moments.

Je souhaite, à présent, m'adresser tout particulièrement à toute ma famille : ma grand-mère, mes parents, mon parrain, Miel Pops, Nessie, mes cousins, ... qui m'ont encouragée, aidée, supportée (cela a du être dur parfois), conseillée, aimée et qui m'ont fait confiance durant toutes ces années d'études. Merci à eux, ils ont été mon soutien le plus fidèle.

Enfin, ces quatre années ont été le fruit d'une étroite collaboration avec *Pseudomonas fluorescens* que je tiens à remercier de ne m'avoir (presque) jamais fait faux bond !

Résumé

La qualité microbiologique de l'eau potable peut fortement se dégrader au cours de son transport dans les réseaux de distribution en raison notamment du détachement de bactéries présentes au sein de biofilms qui se développent inévitablement à la surface interne des canalisations.

Cette étude développe une approche originale consistant à évaluer *in situ* et en temps réel la stabilité microbiologique d'une eau *via* l'empreinte spectrale infrarouge (IR) en mode réflexion totale atténuée (ATR) d'un jeune biofilm de référence constitué d'une monocouche de bactéries. *Pseudomonas fluorescens* a été choisie comme bactérie modèle. Ses signatures spectrales, infrarouge et Raman, ont été étudiées dans un premier temps à l'état planctonique et ce en fonction de la phase de croissance et de l'état d'hydratation. Le suivi *in situ*, *via* une cellule IR-ATR à circulation, des premières étapes de l'adhésion bactérienne, a ensuite permis de déterminer les conditions opératoires optimales de formation sur le cristal ATR du biofilm de référence. La structure de ce dernier a été caractérisée par microspectrométrie Raman et microscopie à épifluorescence. Enfin, la réponse du biofilm de référence exposé à des eaux contenant différentes quantités de carbone organique dissous (COD), facteur clé de la biostabilité d'une eau, a été analysée. Cette dernière partie montre très clairement la dynamique de croissance du biofilm et la corrélation entre les changements observés dans le profil spectral du biofilm naissant et les variations de la quantité de COD, et illustre le potentiel que pourrait présenter la méthode proposée en matière de gestion de la qualité microbiologique des eaux de distribution.

Mots-clés : qualité microbiologique des eaux, *Pseudomonas fluorescens*, spectroscopie infrarouge en mode ATR, IRTF-ATR, microspectrométrie Raman, carbone organique dissous, biofilm, suivi *in situ*, réseaux de distribution, étapes initiales d'adhésion.

Abstract

Drinking water biostability can evolve during its transport through distribution systems because of several factors. Bacterial biofilms which develop on the inner surface of pipes can detach and can consequently be a major source of contamination.

This study evaluates the feasibility to assess, in real time, drinking water biostability by monitoring *in situ* the evolution of the Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform InfraRed (ATR-FTIR) fingerprint of a nascent reference biofilm exposed to water under test. *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13 was chosen as the reference bacteria to form the monolayer reference biofilm. Its IR and Raman fingerprints were studied, in a first step, in planktonic state in accordance with growth phases and degree of hydration. Then, optimal experimental conditions were determined by following *in situ* and in real time the first steps of bacterial adhesion thanks to an ATR flow cell. Biofilm structure was characterised by Raman microspectroscopy and epifluorescence microscopy. Finally, the reference biofilm response was analysed when biofilm was exposed to different dissolved organic carbon (DOC) quantities in filtered drinking water. This parameter was chosen because its significant role in bacterial regrowth in drinking water distribution system. The last part clearly shows the dynamic response of biofilm growth and the relationship between the spectral profiles changes and DOC variations. Moreover, it illustrates the potential of the developed method to manage drinking water stability.

Keywords: drinking water microbiological quality, *Pseudomonas fluorescens*, Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform InfraRed spectroscopy (ATR-FTIR), Raman microspectrometry, dissolved organic carbon, biofilm, *in situ*, distribution systems, initial steps of adhesion.

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Introduction.....1

Références bibliographiques de l'introduction

Chapitre I Etude bibliographique.....	7
I - I. Le modèle bactérien : <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
I - I.1. Propriétés générales	11
I - I.1.1. Des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
I - I.1.2. De <i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	12
I - I.2. Organisation générale	13
I - I.3. La croissance bactérienne.....	16
I - I.3.1. Définition	16
I - I.3.2. Besoins nutritionnels	17
I - I.3.3. Moyens d'étude de la croissance.....	17
I - I.3.4. Courbes de croissance	18
I - II. Les biofilms bactériens.....	20
I - II.1. Définition du terme 'biofilm'.....	21
I - II.2. Composition, formation et évolution des biofilms.....	22
I - II.2.1. Composition	22
I - II.2.2. Etapes de formation et d'évolution des biofilms	23
I - II.2.3. Rôle du film conditionnant pour la formation des biofilms	24
I - II.2.4. Paramètres affectant le détachement des biofilms	25
I - III. Les biofilms et l'eau du réseau de distribution : qualité microbienne de l'eau du réseau	26

I - III.1. Exemples de dégradation microbiologique de l'eau du réseau	28
I - III.2. Relation entre la qualité microbiologique de l'eau ingérée et la santé des consommateurs	28
I - IV. Biostabilité de l'eau du réseau	29
I - IV.1. Définition de la biostabilité.....	29
I - IV.2. Facteurs de la croissance bactérienne.....	29
I - IV.2.1. Le carbone.....	29
I - IV.2.2. L'azote et le phosphore	30
I - IV.2.3. Autres sources de nutriments	30
I - IV.3. Méthodes d'évaluation de la croissance bactérienne à l'intérieur des systèmes d'eau du réseau de distribution.....	30
I - IV.3.1. Méthodes standard	30
I - IV.3.2. Méthodes basées sur la biologie moléculaire	32
I - IV.3.3. Mesure de la vitesse de formation du biofilm (BFR)	33
I - V. Méthodes de détection des biofilms.....	34
I - V.1. Les méthodes électrochimiques.....	35
I - V.2. Les méthodes basées sur la fluorescence	36
I - V.3. Autres méthodes	36
I - V.4. Applications de la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR).....	37
 Références bibliographiques du chapitre I	 39
Table des illustrations.....	51
 Chapitre II Matériel et Méthodes.....	 53
II - I. Matériel	57
II - I.1. Souche utilisée : <i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	57
II - I.2. Milieux nutritifs.....	57
II - I.2.1. Milieu de conservation	57
II - I.2.2. Milieux de culture	58
II - I.3. Eaux	58
II - I.4. Fluorochrome de marquage : le SYBR GREEN II	59
II - I.5. Verrerie utilisée lors des analyses de carbone	59

II - II. Méthodes de préparation des échantillons.....	59
II - II.1. Analyses de la quantité de carbone organique dissous total.....	59
II - II.1.1. Principe de la mesure	59
II - II.1.2. Préparation de la gamme étalon.....	60
II - II.1.3. Déroulement des mesures.....	60
II - II.2. Préparation des échantillons bactériens.....	61
II - II.2.1. Conditions de culture de <i>P. fluorescens</i> CIP 69.13 et établissement des courbes de croissance	61
II - II.2.2. Préparation des culots bactériens.....	61
II - II.2.3. Préparation des suspensions bactériennes pour les expériences IR-ATR	61
II - II.2.4. Lyophilisation des échantillons bactériens	62
II - II.2.5. Préparation des pastilles pour les analyses IR en Transmission	62
II - II.3. Protocoles expérimentaux pour le comptage des UFC	62
II - II.3.1. Cas des suspensions bactériennes	62
II - II.3.2. Cas des biofilms.....	64
II - II.4. Marquage des biofilms	64
II - III. Méthodes spectroscopiques	65
II - III.1. La spectroscopie Infrarouge	65
II - III.1.1. Principe.....	66
II - III.1.2. Exemple de vibrations rencontrées dans les protéines.....	66
II - III.2. Spectroscopie IR en mode Transmission	67
II - III.3. Spectroscopie IR en mode ATR	68
II - III.3.1. Principe.....	68
II - III.3.2. Caractéristiques de l'onde évanescente	68
II - III.3.3. Profondeur de pénétration effective D_e	70
II - III.3.4. Les accessoires et cristaux ATR.....	72
II - III.3.5. Enregistrement des spectres	76
II - III.3.6. Traitement des spectres.....	77
II - III.4. Spectrométrie Raman.....	77
II - III.4.1. Principe.....	77
II - III.4.2. Spectromètre Raman.....	79
II - III.4.3. Acquisition et traitement des spectres.....	79

Références bibliographiques du chapitre II	81
Table des illustrations	83
Chapitre III Phases de croissance et empreintes spectrales IR et Raman de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sous forme planctonique	85
III - I. Courbes de croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	89
III - II. Analyse des culots bactériens par IRTF.....	92
III - II.1. Empreintes spectrales de culots et attributions	92
III - II.2. Comparaison des spectres en transmission et en ATR.....	97
III - II.3. Evolution des empreintes IR bactériennes au cours des phases de croissance	100
III - II.3.1. Région située entre 1750 et 1500 cm ⁻¹	102
III - II.3.2. Région située entre 1200 et 1000 cm ⁻¹	102
III - II.3.3. Région située entre 3000 et 2800 cm ⁻¹	104
III - III. Analyse des culots par microspectrométrie Raman	109
III - III.1. Profil général d'un spectre bactérien et attribution.....	109
III - III.2. Evolution du profil spectral de <i>P. fluorescens</i> aux différentes phases de croissance	115
III - IV. Apports des deux techniques pour l'analyse des culots de <i>P. fluorescens</i>	117
Références bibliographiques du chapitre III	119
Table des illustrations	123
Chapitre IV Suivi et analyse, par spectroscopie vibrationnelle, de l'adhésion de <i>P. fluorescens</i> sur des cristaux ATR de germanium	125
IV - I. Empreintes spectrales IR de <i>P. fluorescens</i> adhérees à la surface du cristal ATR de germanium	130
IV - I.1. Rappel sur le dispositif expérimental servant au suivi de l'adhésion bactérienne.....	130
IV - I.2. Exemple d'une cinétique d'adhésion bactérienne	131
IV - I.3. Spectre de <i>P. fluorescens</i> adhérees à la surface du cristal ATR de germanium	132

IV - I.3.1. Région située entre 3600 et 3000 cm^{-1}	134
IV - I.3.2. Région située entre 3000 et 2800 cm^{-1}	134
IV - I.3.3. Région située entre 1750 et 1500 cm^{-1}	134
IV - I.3.4. Région située entre 1500 et 1350 cm^{-1}	136
IV - I.3.5. Région située entre 1350 et 1200 cm^{-1}	136
IV - I.3.6. Région située entre 1200 et 900 cm^{-1}	136
IV - I.3.7. Conclusion.....	137
IV - I.4. Corrélation Aire de la bande Amide II – Nombre d'UFC.....	137
IV - II. Nature du film primaire obtenu à la surface du germanium par passage d'une solution stérile de LB.....	140
IV - II.1. Caractérisation des composés du milieu nutritif LB s'adsorbant à la surface des cristaux ATR de germanium	140
IV - II.2. Cinétique d'adsorption des composés du milieu LB à la surface du germanium.....	143
IV - III. Adhésion de <i>P. fluorescens</i> à la surface du cristal	144
IV - III.1. Influence de la présence d'un film primaire à la surface du germanium sur l'adhésion bactérienne.....	144
IV - III.2. Adhésion de <i>P. fluorescens</i> en fonction de la concentration en LB.....	146
IV - III.3. Influence de la concentration initiale bactérienne inoculée	148
IV - III.4. Influence du temps d'inoculation	149
IV - IV. Biofilm de référence	153
IV - IV.1. Synthèse des conditions expérimentales retenues pour la formation du biofilm modèle	153
IV - IV.2. Aspect macroscopique	153
IV - IV.3. Aspect microscopique.....	154
IV - IV.4. Artefacts liés aux expériences pouvant perturber les spectres bactériens	156
IV - V. Analyse de jeunes biofilms de <i>P. fluorescens</i> par microspectrométrie Raman .	158
IV - V.1. Comparaison de spectres de <i>P. fluorescens</i> sous forme planctonique et sous forme sessile	158
IV - V.2. Comparaison de spectres de biofilms âgés de 5h	160
Références bibliographiques du chapitre IV	165
Table des illustrations	169

Chapitre V : Réponse d'un jeune biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i> aux variations de concentration en Carbone Organique Dissous dans l'eau	173
V - I. Influence de la concentration en Carbone Organique Dissous dans l'eau testée	177
V - I.1. Réponse du biofilm exposé au milieu nutritif LB.....	177
V - I.2. Réponse du biofilm à l'eau de réseau	180
V - I.3. Comparaison de la réponse du biofilm de référence exposé à des échantillons d'eau contenant différentes quantités de COD	180
V - II. Evolution d'un biofilm de référence exposé successivement à des eaux contenant différentes quantités de COD	183
V - II.1. Cinétique d'évolution de la biomasse bactérienne sur 12 jours.....	183
V - II.1.1. Recroissance du biofilm dans un milieu plus riche en nutriments.....	185
V - II.1.2. Evolution du profil spectral du biofilm en fonction du temps et de la concentration en COD.....	189
V - III. Intérêts de notre contribution dans le suivi de la biostabilité de l'eau du réseau	193
Références bibliographiques du chapitre V	195
Table des illustrations du chapitre V	199
Conclusion	201
Liste des publications et communications.....	207
Publication AEM.....	214

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

COA : carbone organique assimilable

ARN : acide ribonucléique

COD : Carbone Organique Dissous

CODB : Carbone Organique Dissous Biodégradable

DO_i : Densité Optique à la longueur d'onde i (nm)

EPS : substances polymériques extracellulaires

FC : film conditionnant

Ge : germanium

IRTF-ATR : Infrarouge à Transformée de Fourier mode Réflexion Totale Atténuée

LB : Luria Bertani selon Miller

LPS : lipopolysaccharides

μ : taux de croissance

P.fluorescens : *Pseudomonas fluorescens*

PS : polysaccharides

T_g : temps de génération

Tpm : tours par minute

UFC : unité formant colonie

INTRODUCTION

L'eau du réseau de distribution est le produit alimentaire le plus consommé et le plus surveillé car les causes de contamination sont nombreuses et peuvent être à l'origine de troubles sanitaires graves pour le consommateur. Des études épidémiologiques entreprises au Canada par Payment (1991-1997)¹, et en France par Zmirou (1986-2001)² ont établi une relation entre la santé des populations et la qualité de l'eau. Par exemple, 10% des cas de gastroentérites avérés, résulteraient d'une consommation d'eau du robinet. De telles données recoupent celles détenues par l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization WHO)³ qui estime que les maladies provoquées par la consommation d'eau du réseau représentent un risque sanitaire important.

Depuis plus d'une centaine d'années, il est admis que les bactéries, présentes dans l'eau se fixent, dans un premier temps, aux parois des canalisations puis se développent à leur surface⁴. L'attachement sur une surface est une stratégie de survie qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement plus favorable. Après leur adhésion irréversible, les bactéries vont se développer au sein d'une communauté organisée communément nommée *biofilm*. Le développement d'un biofilm est déterminé par un équilibre entre des processus d'attachement, de croissance et de détachement des microorganismes. Le détachement bactérien, défini comme le retour de cellules adhérees à l'état planctonique, est un des processus les plus préjudiciables à la qualité microbiologique de l'eau.

Actuellement, le prélèvement et l'analyse d'échantillons (d'eau ou de canalisation) au niveau de points critiques de contrôle, qualifiés de points stratégiques, ne donne qu'une « photo instantanée » d'une partie de l'état du système. Les méthodes standard utilisées pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau du réseau reposent essentiellement sur l'estimation de la biomasse et la quantification du carbone organique dissous biodégradable, par culture bactérienne. Elles présentent des temps de réponse trop longs (24 à 72h) pour assurer une gestion efficace de la distribution de l'eau. De plus, il s'agit de méthodes en batch qui ne permettent pas un suivi en temps réel et *in situ* de la qualité microbiologique de l'eau. Par conséquent, en dépit des difficultés que constitue l'accès à la surface interne des tuyaux, des mesures en continu, non destructives, et *in situ* du développement des biofilms permettraient d'optimiser le contrôle des systèmes de distribution d'eau.

C'est dans ce contexte qu'a été mis en place le contrat européen SAFER (Fifth Framework Programme, 'Energy, Environment and sustainable development programme',

n° EVK1-2002-00108), dans lequel s'est inscrit ce travail. Il a permis la mise en commun des compétences en microbiologie et en physico-chimie de sept laboratoires européens* et du centre de recherche 'Anjou Recherche' de Veolia Eau (Maisons Laffitte).

Les objectifs du contrat SAFER étaient triples :

- ☞ *fournir des systèmes de suivi de l'état et du développement des biofilms*
- ☞ *développer un jeu de méthodes pour détecter les pathogènes bactériens et protozoaires dans les biofilms aquatiques*
- ☞ *développer un suivi rapide de l'efficacité de la désinfection*

Le travail présenté dans ce manuscrit tente de répondre principalement au premier objectif. Ceci étant, même si les expériences n'ont pas été conduites dans ce sens, la méthode proposée dans cette thèse pourrait être aussi envisagée pour atteindre le troisième objectif. Diverses techniques permettent déjà d'étudier en temps réel, *in situ*, et de manière non destructive le développement et l'architecture des biofilms. Parmi ces méthodes, qui seront développées dans le chapitre I, la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR) est un outil de choix car elle permet de suivre, *in situ*, les premières étapes de la formation d'un biofilm. Cette technique permet en effet de sonder l'interface matériau/biofilm sur une épaisseur de l'ordre du micron. De plus, une étude de Boualam et al.⁵ a montré que le suivi de la signature spectrale de biofilms par IRTF-ATR permettait, en moins de 10h, de différencier des échantillons d'eau contenant des quantités différentes de matière organique biodégradable. Or, cette dernière constitue un des paramètres clés de la recroissance bactérienne au sein des réseaux de distribution. Nous avons donc exploré la possibilité de détecter les variations de la qualité microbiologique d'une eau *via* les modifications de la signature spectrale IR-ATR d'un jeune biofilm de référence monospèce exposé à l'eau testée dans laquelle nous avons choisi de faire varier la concentration en Carbone Organique Dissous (COD), paramètre clé de la recroissance bactérienne.

Pseudomonas fluorescens (*P.fluorescens*) a été retenue comme bactérie modèle par les partenaires européens. Un tel choix a été dicté par différentes raisons : i) sa non-pathogénicité ; ii) sa présence dans l'eau du réseau de distribution ; iii) sa capacité à croître dans des milieux peu nutritifs ; iv) son utilisation dans une méthode standard de détermination de la quantité de carbone organique assimilable dans les eaux ; v) son appartenance au groupe bactérien *Pseudomonas* qui est un bon indicateur du potentiel de recroissance des microorganismes dans l'eau de réseau.

Cinq chapitres composent ce manuscrit. Ils permettent chacun de progresser dans la compréhension du système retenu.

Une étude bibliographique rappelle, dans un premier temps (chapitre I) des notions fondamentales concernant les bactéries et leur organisation sous forme de biofilms, notamment dans l'eau du réseau. Une description des méthodes permettant d'évaluer la qualité microbiologique des eaux et détecter les biofilms, est également présentée.

Les méthodes et protocoles expérimentaux suivis au cours de ce travail sont décrits dans le chapitre II.

Le chapitre III s'intéresse aux signatures spectrales infrarouge et Raman de culots de *P. fluorescens* à différentes phases de croissance. Une attribution des spectres est proposée. Les signatures IR obtenues respectivement en mode de transmission et en mode ATR sont comparées notamment pour déterminer l'influence de l'hydratation.

Le chapitre IV est consacré à l'étude des étapes initiales d'adhésion de *P. fluorescens* en suivant par IR-ATR l'évolution de sa signature spectrale. L'influence de différents paramètres sur la formation du biofilm de référence est discutée afin d'établir les conditions opératoires optimales pour l'obtention de ce dernier.

Enfin dans le dernier chapitre, la réponse du biofilm de référence naissant lorsqu'il est exposé à des eaux dont la quantité en COD varie est analysée et discutée au vu de l'évolution de sa signature spectrale IR-ATR.

Références bibliographiques de l'introduction

1. Payment P. & Hartemann P. Les contaminants de l'eau et leurs effets sur la santé. *Revue des Sciences de l'Eau* **11**, 199-210 (1998).
2. Zmirou D. *et al.* Quels risques pour notre santé? France (2000).
3. WHO & OECD. Assessing microbial safety of drinking water - Improving approaches and methods. IWA Publishing, (2003).
4. O'Toole G.A., Kaplan H.B. & Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**, 49-79 (2000).
5. Boualam, M., Quilès, F., Mathieu, L. & Block, J.C. Monitoring the effect of organic matter on biofilm growth in low nutritive waters by ATR/FT-IR spectroscopy. *Biofouling* **18**, 73-81 (2002).

* Liste des laboratoires de recherche européens du programme SAFER :

- the Institute of Gas Heat and Water Technologies (Riga, Lettonie);
- the Department of Biological Engineering (Braga, Portugal);
- the Department of Chemical Engineering/Laboratory for Process Engineering, Environment and Energy (Porto, Portugal);
- the Department of Environmental Sciences (Kuopio, Finlande);
- the School of Biological Sciences (Southampton, Royaume Uni);
- Microbiology/IWW Rheinisch-Westfaelidches Institut für Wasserforschung gemeinnuetzige GmbH (Muelheim, Allemagne),
- Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME, Villers-lès-Nancy, France).

Chapitre I

Etude bibliographique

Sommaire du chapitre I

I – I. Le modèle bactérien : <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
I – I.1. Propriétés générales.....	11
I – I.1.1. Des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
I – I.1.2. De <i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13.....	12
I – I.2. Organisation générale.....	13
I – I.3. La croissance bactérienne.....	16
I – I.3.1. Définition.....	16
I – I.3.2. Besoins nutritionnels.....	17
I – I.3.3. Moyens d'étude de la croissance	17
I – I.3.4. Courbes de croissance.....	18
I – II. Les biofilms bactériens	20
I – II.1. Définition du terme 'biofilm'.....	21
I – II.2. Composition, formation et évolution des biofilms.....	22
I – II.2.1. Composition.....	22
I – II.2.2. Etapes de formation et d'évolution des biofilms.....	23
I – II.2.3. Rôle du film conditionnant pour la formation des biofilms.....	24
I – II.2.4. Paramètres affectant le détachement des biofilms.....	25
I – III. Les biofilms et l'eau du réseau de distribution : qualité microbienne de l'eau du réseau	26
I – III.1. Exemples de dégradation microbiologique de l'eau du réseau.....	28
I – III.2. Relation entre la qualité microbiologique de l'eau ingérée et la santé des consommateurs.....	28
I – IV. Biostabilité de l'eau du réseau	29
I – IV.1. Définition de la biostabilité.....	29
I – IV.2. Facteurs de la croissance bactérienne.....	29
I – IV.2.1. Le carbone.....	29
I – IV.2.2. L'azote et le phosphore.....	30
I – IV.2.3. Autres sources de nutriments.....	30
I – IV.3. Méthodes d'évaluation de la croissance bactérienne à l'intérieur des systèmes d'eau du réseau de distribution.....	30
I – IV.3.1. Méthodes standard.....	30
I – IV.3.2. Méthodes basées sur la biologie moléculaire.....	32
I – IV.3.3. Mesure de la vitesse de formation du biofilm (BFR).....	33
I – V. Méthodes de détection des biofilms	34
I – V.1. Les méthodes électrochimiques.....	35
I – V.2. Les méthodes basées sur la fluorescence.....	36
I – V.3. Autres méthodes.....	36
I – V.4. Applications de la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR).....	37

I - I. Le modèle bactérien : *Pseudomonas fluorescens*

I - I.1. Propriétés générales

I - I.1.1. Des *Pseudomonas fluorescens*

Selon le Bergey's Manual¹, le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Il s'agit de bacilles Gram-négatif, aérobies stricts, oxydase positif, mobiles (présence de un ou plusieurs flagelles), capables de se multiplier sur des milieux usuels, et incapables de fermenter le glucose. Ces bactéries produisent un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme, lorsqu'elles sont au contact de milieux carencés en fer². Leur métabolisme respiratoire est très actif : de nombreux *Pseudomonas* sont retrouvés dans les stations d'épuration où ils dégradent les déchets de l'Homme (par exemple, minéralisation des résidus de lessive).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires rencontrées dans les sols^{3,4}, sur les racines des végétaux, sur les plantes en pot ou coupées, ainsi que dans les eaux douces et marines. De nombreuses souches peuvent se développer à basse température (souches psychrophiles) et en conséquence contaminer les denrées alimentaires telles que les viandes⁵, le lait, les fromages mais également les échantillons de sang conservés au réfrigérateur ce qui peut entraîner une septicémie post-transfusionnelle⁶.

Ce sont également des bactéries extrêmement résistantes aux antibiotiques et antiseptiques, ce qui explique leur présence fréquente en milieu hospitalier⁷. Elles se comportent comme des pathogènes⁸ opportunistes et sont, avec les staphylocoques et les entérobactéries, responsables de la plupart des infections nosocomiales^{9,10}.

L'utilisation de *P. fluorescens* peut toutefois s'avérer efficace lorsqu'il s'agit de protéger les racines et les graines de végétaux contre les infections dues aux champignons¹¹. Ceci est rendu possible par la production de métabolites secondaires. Une compétition s'engage dès lors entre ces métabolites et les pathogènes nuisibles au végétal. Ceci conduit à une exclusion de ces derniers et à une colonisation de la rhizosphère par *P. fluorescens*. Son pouvoir inhibiteur et protecteur permet de lutter contre la fusariose de la tomate¹² ou encore de protéger le champignon de couche¹³.

D'autres souches telles que *Pseudomonas* sp. YAYA6¹⁴, *Pseudomonas* sp. ADP¹⁵, ont été isolées et reconnues pour leur capacité à minéraliser rapidement l'atrazine, herbicide polluant les sols et les eaux.

Par ailleurs, des études réalisées par Falla et Block¹⁶ ont mis en évidence la faculté des enveloppes cellulaires (membrane cytoplasmique, peptidoglycane, membrane externe) de *P. fluorescens* de complexer des métaux tels que le nickel, le cuivre et le zinc. Du fait de leur capacité à se développer dans des milieux nutritifs pauvres, les Pseudomonadaceae, et plus particulièrement les *Pseudomonas*, sont considérés comme des indicateurs de contamination d'eau du réseau¹⁷. Les *Pseudomonas* permettent la biodégradation d'une proportion importante de molécules présentes dans l'eau et peuvent être isolées des réservoirs d'eaux du réseau de distribution¹⁸, ainsi que de l'eau du réseau ou de surface^{19,20}.

I - I.1.2. De *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13

Pseudomonas fluorescens CIP 69.13, abrégée dans la suite de l'étude par *P. fluorescens*, a été isolée d'eaux douces pour la première fois par M.E. Rhodes en 1951²¹. C'est un bacille Gram-négatif, Biotype A (d'après la classification établie par Stanier et *al.* en 1966²²), aérobic strict, oxydase positif, et pourvu de flagelles polaires qui leur permet d'être mobiles. *P. fluorescens* est citrate et nitrates positifs, hydrolyse les protéines mais pas l'amidon. Sa température optimale de croissance, dans du milieu Luria Bertani, se situe entre 25 et 30°C, en aérobic.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, *P. fluorescens* a été choisi comme bactérie modèle pour la formation du biofilm de référence pour plusieurs raisons. Les principales sont : i) sa non-pathogénicité ; ii) sa présence dans l'eau du réseau de distribution²⁰ ; iii) sa capacité à croître dans des milieux peu nutritifs²³ ; iv) son utilisation dans une méthode standard de détermination de la quantité de carbone organique assimilable dans les eaux^{23,24} ; v) son appartenance au groupe bactérien *Pseudomonas* qui est un bon indicateur du potentiel de recroissance des microorganismes dans l'eau du réseau¹⁷ et VI) sa capacité à coloniser les surfaces²⁵⁻²⁷.

I - I.2.Organisation générale

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes dont la taille varie entre 0,5 et 10 μm . Elles présentent des formes variées : coques (diplocoques, amas, chaînettes), bacilles (droits, incurvés, spiralés).

L'eau est le principal composant d'une cellule et représente 80 à 90% du poids de la bactérie. La composition globale en macromolécules varie d'une espèce à l'autre. On trouve en moyenne : 55% de protéines, 9,1% de lipides, 3,4% de lipopolysaccharides, 2,5% de peptidoglycane, 20,5% d'ARN, 3% d'ADN (pourcentages sur poids sec total de cellules d'*E. coli*)²⁸. A ces éléments s'ajoutent le soufre ainsi que d'autres ions tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ présents en faibles quantités.

L'intérieur d'une cellule bactérienne est constitué de structures dispersées dans le cytoplasme. Ce dernier est un hydrogel colloïdal comprenant une phase dispersante composée de protéines et de sels minéraux et une phase dispersée dans laquelle se trouvent des ribosomes et diverses inclusions. On y trouve également le chromosome bactérien, support de l'information génétique qui est aussi en contact avec la membrane plasmique au niveau de replis membranaires appelés mésosomes. La Figure I- 1 propose un schéma détaillé d'une cellule bactérienne²⁸.

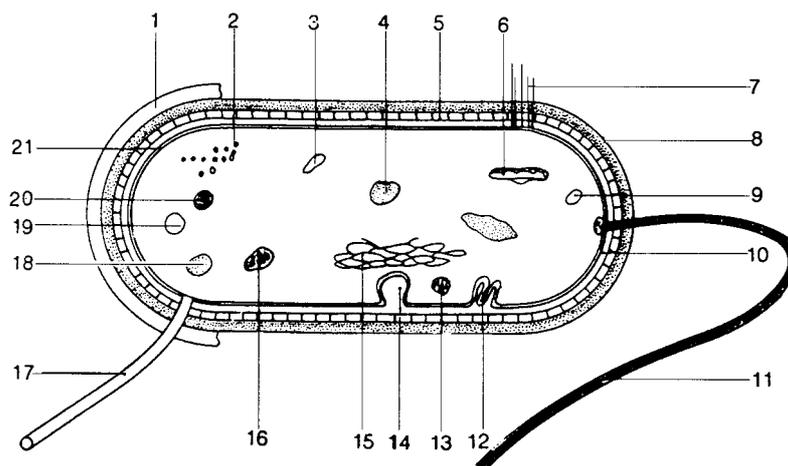


Figure I- 1 : Schéma d'une bactérie Gram-négatif. Les numéros correspondent respectivement à : 1. Capsule, 2. Ribosomes, 3. Vacuole à gaz, 4. Glycogène, 5. Mucopéptide, 6. Plasmide, 7. Pili, 8. Membrane externe, 9. Lipides, 10. Granule basal, 11. Flagelle, 12. Chromatophore, 13. Carboxysome, 14. Mésosome, 15. Matériel nucléaire, 16. Carbonate de calcium, 17. Pili sexuel, 18. Soufre, 19. Polyphosphate, 20. poly-β-hydroxybutyrate, 21. Membrane cytoplasmique

Les bactéries possèdent une enveloppe externe rigide que l'on appelle paroi. La paroi joue un double rôle : elle confère à la bactérie sa forme et assure le maintien de l'intégrité des cellules face à la forte pression osmotique intracellulaire.

Contrairement aux bactéries à Gram-positif, les bactéries à Gram-négatif, telles que *P. fluorescens*, possèdent une membrane externe en plus du peptidoglycane (Figure I- 2).

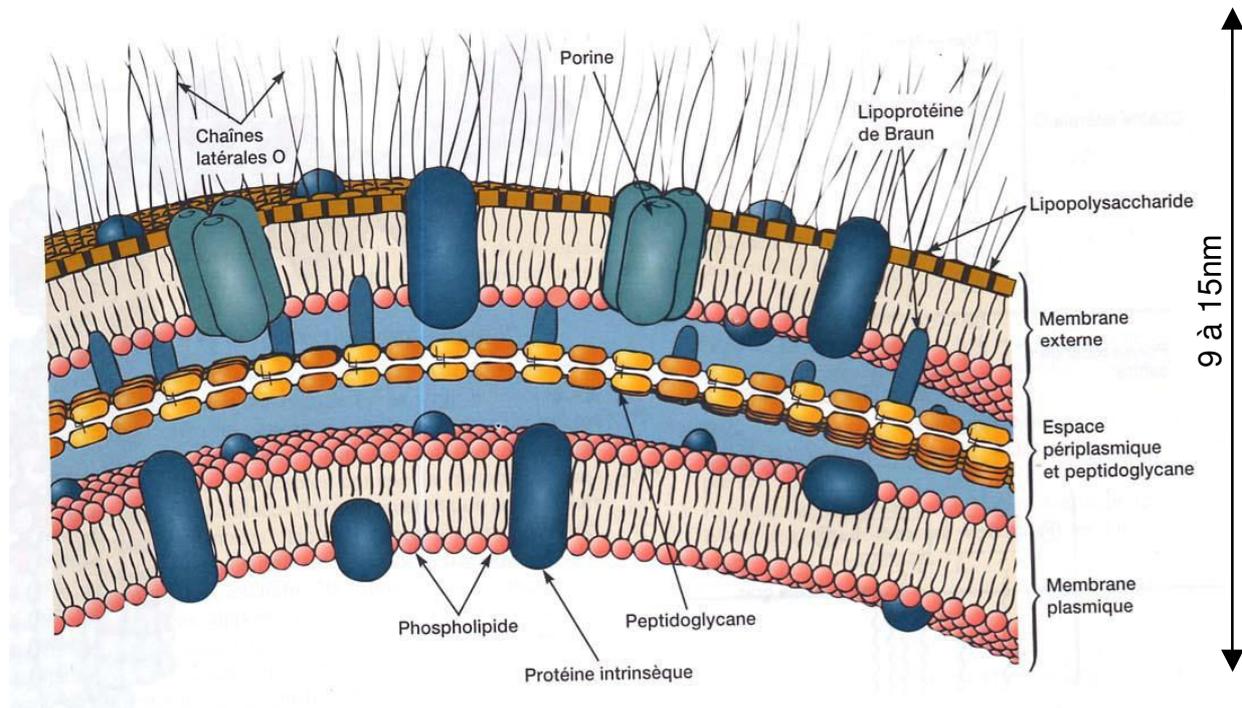


Figure I- 2 : Coupe de l'enveloppe d'une bactérie Gram-négatif²⁹

Il s'agit d'une bicouche asymétrique hydrophobe, liée au peptidoglycane grâce à la lipoprotéine de Braun. Elle est constituée de grandes molécules complexes telles que les phospholipides, les protéines (porines), les lipopolysaccharides (LPS) contenant des lipides et des glucides. Les LPS se composent de trois parties : 1) le lipide A (contenant des acides gras, des phosphates ou pyrophosphates), 2) le polysaccharide central (contenant des sucres et des phosphates), 3) la chaîne latérale O.

Dans le cas de *P. fluorescens*, une étude réalisée par Falla et *al.*³⁰ a montré que la membrane externe constitue 6,96% du poids sec total des cellules entières et 56% du poids sec de la paroi. Le peptidoglycane et la membrane plasmique représentent respectivement 5,3% et 6,12% du poids sec total de la bactérie.

Le Tableau I-1 propose un récapitulatif des principaux constituants d'une cellule Gram-négatif, leur composition, ainsi que les fonctions qui leur sont associés.

Constituants de la cellule bactérienne	Composition chimique	Fonctions
Les composés de surface		
Les flagelles	- protéine (flagelline) (Ø 10-20nm, L 15-20 µm)	- mobilité bactérienne
Les pili (ou fimbriae) sexuels et communs	- protéine polymérisée (piline) (L 10 µm ou plus)	- adhésion - conjugaison bactérienne - récepteurs de bactériophages
La capsule	- polysides contenant 99% d'eau	- adhésion des bactéries - pouvoir pathogène - constitution d'antigènes protecteurs - protection contre la dessiccation
Les couches S	- Protéines ou glycoprotéines	- adhésion - protection contre les bactériophages
Les enveloppes bactériennes		
La membrane externe	- bicouche lipidique hydrophobe - lipopolysaccharides (lipide hydrophobe, centre polysaccharidique, chaîne polysaccharidique spécifique) - protéines (structurales ou non, porines, fibrines) - lipoprotéines de Braun (polypeptides de 58 acides aminés portant à leur extrémité N-terminale des constituants lipidiques)	- permet le passage de petites molécules hydrophiles (glucose, saccharose, acides aminés) - perméabilité aux nutriments, antibiotiques - rôle dans les propriétés antigéniques - régulation du fer - les lipoprotéines de Braun relient la membrane externe au peptidoglycane et participe à la cohésion structurale des enveloppes
L'espace périplasmique	- eau - protéines	- participe à la cohésion de la paroi - séquestration et mobilisation des enzymes de dégradation (phosphatases, ribonucléases, β-lactamases) - dégradation de substrats complexes, inactivation de produits toxiques - cibles de nombreux antibiotiques
Le peptidoglycane	- polyside d'unités répétitives d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine à chaînes courtes pentapeptidiques	- assure la survie et l'intégrité de la cellule
La membrane cytoplasmique	- 2 feuillettes de phospholipides (30 à 40%) - protéines transmembranaires ou exposées (60 à 70%)	- respiration (grâce aux enzymes respiratoires) - barrière perméable empêchant le mouvement passif des solutés polaires à travers la membrane - transport des nutriments et des produits

Les structures internes		
Appareil nucléaire	- ADN (80%) - ARN (10%) - protéines (10%)	- siège de l'information génétique - perdre ou acquérir de nouveaux gènes
Les plasmides	- éléments d'ADN de petite taille	- résistance aux antibiotiques, antiseptiques - responsable de la virulence
Les ribosomes	- 90% de l'ARN de la cellule - protéines	- synthèse de protéines (enzymes incluses)
Les granulations de réserve	- glycogène, lipides, polyphosphates, soufre	- réserves énergétiques
Les vacuoles à gaz	- parois constituées de molécules protéiques organisées en feuillets	- flottage bactérien ou maintien des cellules dans des zones stratifiées où les conditions de culture sont favorables

Tableau I- 1 : Composition chimique et fonctions des principaux constituants d'une cellule bactérienne Gram-négatif. Abréviations : Ø = diamètre, L = longueur^{29,31}

Parmi les polysaccharides de surface, on peut distinguer la capsule et le « slime ». La capsule correspond à une structure bien organisée contrairement au slime qui fait référence à des constituants polysaccharidiques plus ou moins libérés dans le milieu. Ces derniers ne constituant pas une véritable entité morphologique n'ont pas été répertoriés parmi les composés de surface.

Il existe également des enzymes exo et endo cellulaires, fabriquées par les bactéries, qui vont permettre la dégradation des macromolécules et leur transformation en molécules plus simples.

I - I.3. La croissance bactérienne

I - I.3.1. Définition

Un cycle cellulaire bactérien se décompose en trois étapes qui sont : l'initiation, la réplication de l'ADN chromosomique et la division cellulaire. La bactérie se multiplie par fission binaire : elle grandit puis se divise en deux cellules filles.

La croissance bactérienne peut être définie comme l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de cellules.

I - I.3.2. Besoins nutritionnels

Les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires. Parmi elles, on peut citer les sources de carbone, d'azote, de soufre et de phosphore. D'autres éléments tels que le sodium, le potassium, le magnésium jouent également un rôle dans le métabolisme bactérien. Le fer, le calcium, le manganèse, le nickel, les vitamines participent, quant à eux, aux réactions enzymatiques ainsi qu'à l'équilibre physico-chimique de la cellule.

Outre ces besoins nutritionnels, d'autres facteurs tels que le pH de la suspension, la concentration en dioxygène dissous, la température ont également leur importance.

I - I.3.3. Moyens d'étude de la croissance

Plusieurs méthodes expérimentales permettent de suivre l'évolution de la population de microorganismes et reposent sur deux grands types de mesures :

☞ Le dénombrement direct des bactéries

Les bactéries sont considérées comme des particules que l'on dénombre à l'état frais ou après marquage par des fluorochromes parmi lesquels le SYBR GREENII, l'Iodure de Propidium, ou l'acridine orange.

☞ Le dénombrement indirect des bactéries

Le principe consiste à évaluer les variations de la densité bactérienne par le dosage de composés tels que l'ATP, le glucose, le CO₂ dont la synthèse est due au métabolisme bactérien ou bien par la mesure des variations d'une grandeur physique du milieu. La mesure de la turbidité est la méthode la plus communément employée car c'est la plus simple à mettre en œuvre. Les techniques mesurant les variations de la masse cellulaire, en déterminant le poids sec des microorganismes, nécessitent une grande quantité de cellules et une mise en œuvre longue (centrifugations, lavages, filtrations) ce qui les rend imprécises.

I - I.3.4. Courbes de croissance

☞ Schéma général et description

Le schéma de la croissance d'une population bactérienne en milieu non renouvelé a été établi par Buchanan (1918)³² (Figure I- 3).

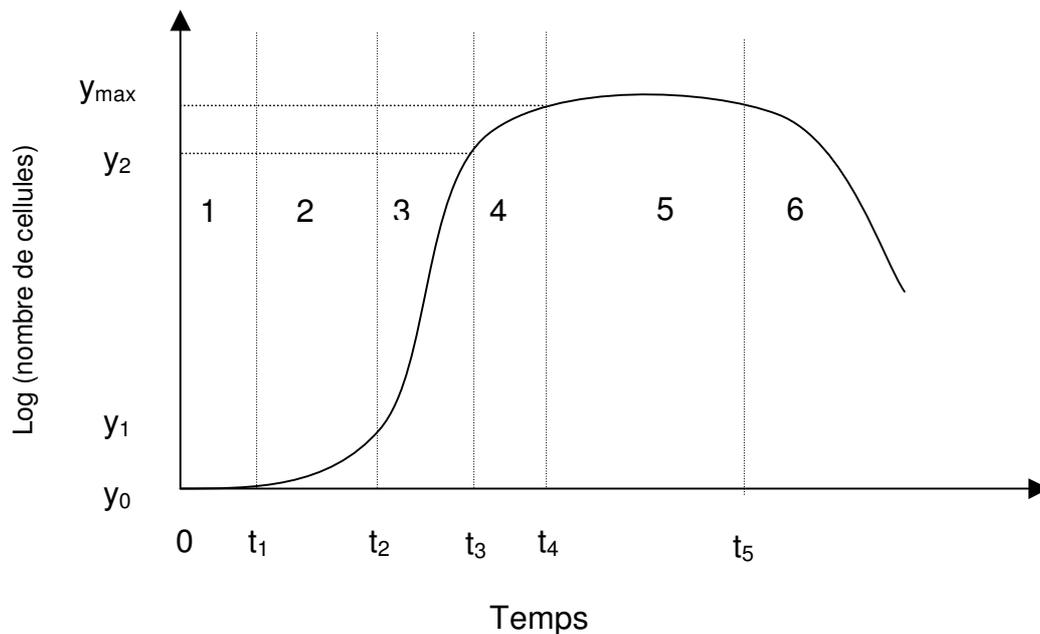


Figure I- 3 : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide, dans un système en batch. Les six phases de croissance sont indiquées par des numéros (voir texte pour leur correspondance).

La cinétique de croissance d'une population microbienne est souvent représentée en coordonnées semi-logarithmiques et se décompose en six phases distinctes :

☞ *La phase de latence (n° 1, Figure I- 3)*

La phase de latence est une phase de transition consécutive à un changement d'environnement d'une population bactérienne (telle que l'inoculation de ces microorganismes dans un bouillon stérile). La bactérie synthétise les enzymes aptes à métaboliser les nutriments. Les cofacteurs essentiels, et les ribosomes doivent également être synthétisés avant que la croissance puisse débuter. Cette dernière dépend de l'espèce bactérienne, de la quantité d'inoculum introduit dans le milieu, de l'âge des microorganismes et de la composition du milieu. La multiplication bactérienne, au cours de

cette phase, est nulle. L'inoculum étant composé de cellules de différents états (vivantes, mortes,...), elles ne sortent pas toutes de la phase de latence simultanément.

☞ *La phase d'accélération (n° 2, Figure I- 3)*

Elle se caractérise par une augmentation de plus en plus rapide de la biomasse. Le taux de croissance devient supérieur à zéro et il augmente progressivement.

☞ *La phase exponentielle (n° 3, Figure I- 3)*

C'est une phase au cours de laquelle les microorganismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible compte tenu de leur potentiel énergétique, et des conditions de culture. La population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques.

Calcul du taux de croissance :

En phase exponentielle, le nombre de bactéries double à intervalle de temps régulier.

Au temps t il y a donc :

$$N_t = N_0 * 2^n \quad \text{bactéries}$$

avec : N_0 le nombre initial de bactéries

N_t le nombre de bactéries au temps t

n le nombre de divisions cellulaires

Soit :

$$n = \frac{\text{Log}N_t - \text{Log}N_0}{\text{Log}2}$$

Le taux de croissance, μ , est le nombre de division par unité de temps. Il s'exprime de la façon suivante :

$$\mu = \frac{n}{t - t_0}$$

Le temps de génération, T_g correspondant au temps de doublement de la population, est donné par :

$$T_g = \frac{1}{\mu}$$

☞ La phase de décélération (n° 4, Figure I- 3)

Elle se caractérise par une régression de la vitesse de croissance.

☞ La phase stationnaire (n° 5, Figure I- 3)

Au cours de la croissance, les nutriments, le dioxygène sont de moins en moins accessibles aux cellules. De plus, il se produit un enrichissement du milieu de culture en sous-produits du métabolisme qui peuvent être toxiques. Ces différents facteurs favorisent l'entrée des bactéries dans la phase stationnaire. Elle est considérée comme la période au cours de laquelle une population bactérienne atteint son niveau maximal et s'y maintient. Le nombre total de microorganismes viables reste constant. Ceci peut résulter soit d'un équilibre entre la division et la mort cellulaire ou bien la population peut cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

☞ La phase de déclin ou phase de mortalité (n° 6, Figure I- 3)

Toutes les ressources nutritives sont épuisées, les métabolites toxiques se sont accumulés. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action d'enzymes libérées par les bactéries. La mort d'une population microbienne suit habituellement une fonction logarithmique.

I - II. Les biofilms bactériens

L'idée selon laquelle les bactéries colonisent les surfaces pour y croître préférentiellement date de plus de 150 ans, et coïncide avec l'apparition de la microbiologie en tant que discipline scientifique³³. Il faudra, néanmoins, attendre Zobel, en 1943³⁴, pour que débutent les premières études spécialisées des biofilms. Selon lui, deux étapes constituent le processus de colonisation bactérienne d'une surface : la première étant l'adhésion réversible et la seconde, l'adhésion irréversible des microorganismes. Un nouvel engouement dans la compréhension de l'association microorganismes / surface et microorganismes / microorganismes eut ensuite lieu à partir des années 70, avec notamment les travaux de Marshall et *al.*³⁵. Dès lors, l'un des principaux objectifs pour les chercheurs, toutes disciplines confondues, est de comprendre les processus de formation et d'évolution des différents types de biofilms existant afin de pouvoir les contrôler et en tirer profit.

I - II.1. Définition du terme 'biofilm'

Il est difficile de donner du terme 'biofilm' une définition précise et universelle. On peut néanmoins en donner les principales caractéristiques à la base de toute définition : les biofilms sont des structures dynamiques et complexes de microorganismes se développant sur toute surface, au contact d'eau et de nutriments. Leurs propriétés peuvent varier au cours du temps, en fonction de la nature des microorganismes mis en jeu et des paramètres physico-chimiques externes. On notera l'importance du terme 'surface' : en effet, des agrégats de microorganismes enrobés dans une matrice exopolymérique peuvent se trouver en suspension et sont, en général, désignés non pas sous le terme biofilm mais sont définis comme des 'flocs'. L'état sessile constitue une réelle stratégie de survie par la mise en place et le développement d'une communauté organisée.

Les biofilms sont ubiquitaires : ils colonisent une grande variété d'environnements aussi bien naturels (les sols, les rivières, les végétaux, les organismes vivants supérieurs) que ceux créés par l'homme (canalisations d'eau, les plates-formes pétrolières etc.).

Quelques exemples de formation de biofilms sont donnés pour illustrer nos propos dans le Tableau I- 2.

<i>Occurrence des biofilms</i>	<i>Effets</i>
à la surface des tubes échangeurs de chaleur	Diminution de la capacité du transfert thermique Réduction des performances de l'échangeur
Au niveau des installations portuaires, sur les coques de bateaux	Corrosion microbienne, dégradation
A la surface de capteurs immergés, sous-marins	Dérive des appareils Performances réduites
Canalisations d'eau du réseau	Dégradation des conduites et de la qualité de l'eau Risques sanitaires
A la surface des dents, des cathéters, des implants chirurgicaux	Risques sanitaires
Au niveau des industries agro-alimentaires (IAA)	Toxi-infections alimentaires collectives ou individuelles par les flores pathogènes ou d'altération Production de polysaccharides utilisés dans les IAA
Filtres biologiques	Elimination de la pollution carbonée, azotée et phosphorée des eaux usées
Au niveau des racines des plantes	Facilitation de l'absorption des nutriments par la plante protection contre les maladies

Tableau I- 2 : Exemples de localisation des biofilms et de leurs effets.

I - II.2. Composition, formation et évolution des biofilms

I - II.2.1. Composition

Un biofilm est composé majoritairement de cellules bactériennes, d'eau et d'EPS. D'une manière plus générale (à l'état planctonique ou à l'état sessile), la plupart des bactéries synthétisent des polymères extracellulaires qui apparaissent soit sous la forme d'une capsule fortement hydratée, attachée à la cellule ou sous la forme d'un « slime » visqueux. Les EPS ne contiennent pas uniquement des polysaccharides, mais également une grande variété de protéines, de glycoprotéines, de glycolipides, de substances humiques ainsi que des quantités non négligeables d'ADN extracellulaire^{36,37}.

I - II.2.2. Etapes de formation et d'évolution des biofilms

La formation du biofilm débute lorsque les bactéries perçoivent les conditions environnementales qui leur seront favorables à la transition de l'état planctonique à l'état sessile^{27,38-40}. Ces signaux extérieurs diffèrent selon les microorganismes. Ainsi, *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* forment-elles des biofilms dans la plupart des conditions permettant la croissance³⁹. Cependant, pour d'autres bactéries, la formation du biofilm pourra être influencée par des facteurs tels que la température, le pH, l'oxygénation³⁸.

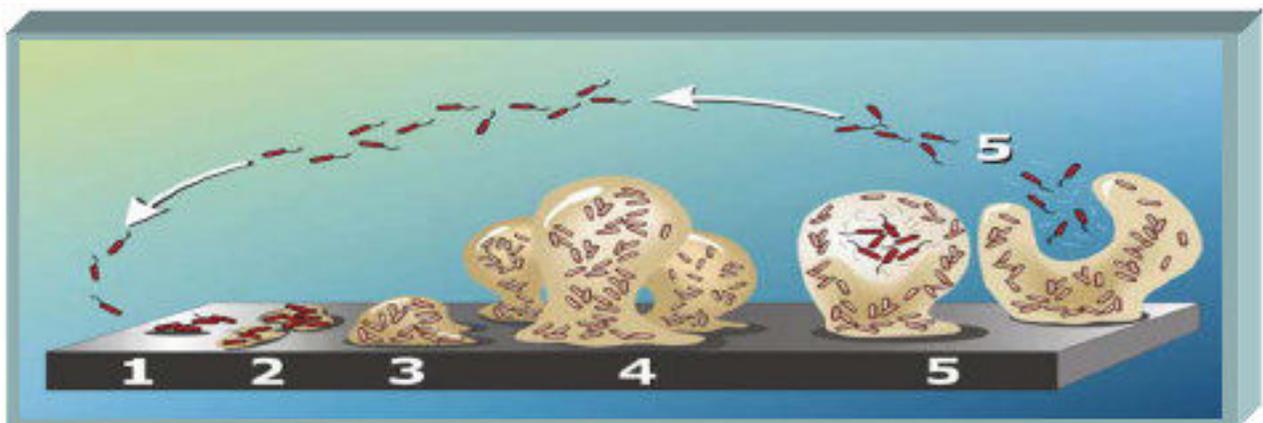


Figure I- 4 : Etapes de formation et d'évolution d'un biofilm selon Costerton³³

L'accumulation d'un biofilm sur une surface est le résultat de processus physiques, chimiques et biologiques nécessitant quelques heures à quelques semaines selon le système. Cinq étapes, numérotées de 1 à 5, se distinguent sur la Figure I- 4 et correspondent :

- au transport des macromolécules organiques (exopolymères, protéines, acides humiques) et/ou inorganiques présentes dans le milieu ou sécrétées par les microorganismes vivant dans ce milieu : c'est la formation du film primaire encore appelé film conditionnant.

- à l'attachement des bactéries d'une manière réversible. Il s'agit de l'adhésion réversible qui met en jeu de faibles interactions (interactions électrostatiques et forces de Van der Waals) entre le support et les cellules.

- à l'adhésion irréversible des microorganismes du fait de la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface. Cette étape met en jeu des interactions de haute énergie telles que des forces du type dipôle-dipôle, des interactions Debye, des interactions ions-dipôle, des liaisons hydrogène ou des ponts polymériques⁴¹

- à la phase de maturation. Lorsque les bactéries ont adhéré à une surface, elles subissent de profonds changements afin de s'adapter à leur nouveau mode de vie. La synthèse d'EPS, les échanges de gènes entre populations, le développement de la résistance aux antibiotiques, aux radiations UV, et l'augmentation de la production de métabolites secondaires font partie des plus importants^{42,43}. En fonction des conditions environnementales, différentes structures s'établissent. Deux exemples de structure en champignons ou en mosaïque sont présentés sur la Figure I- 5.

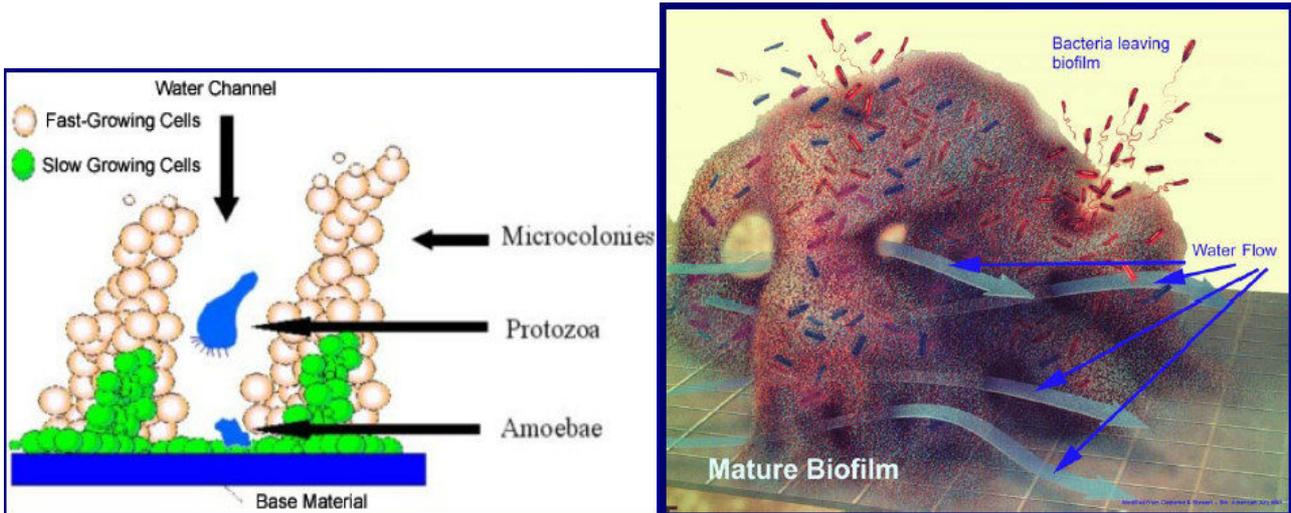


Figure I- 5 : Modèle mosaïque d'un biofilm proposé par Keevil et *al.*⁴⁴ (à gauche) et modèle de biofilm en champignon / canaux d'après Costerton (droite) (<http://Wvlc.uwaterloo.ca/biology447/Biofilms/biofilmsoverview.htm>)

- à la phase de détachement qui résulte de plusieurs phénomènes tels que l'érosion, la desquamation, l'abrasion.

Intéressons-nous plus en détails aux facteurs gouvernant la formation et le détachement des biofilms.

I - II.2.3. Rôle du film conditionnant pour la formation des biofilms

L'attachement des microorganismes aux surfaces est un processus très complexe, dépendant de nombreux facteurs liés au microorganisme, aux caractéristiques physico-chimiques du milieu environnant et aux propriétés de la surface à coloniser. Il peut notamment s'agir de la présence d'un film conditionnant à la surface du substrat sur lequel le biofilm se développera.

Toute surface exposée à un milieu aqueux se recouvre de molécules provenant du milieu extérieur ce qui peut entraîner une modification de l'état de surface du matériau considéré et ainsi une modification des vitesses de colonisation de cette surface par les bactéries. Loeb et Neihof⁴⁵ furent les premiers à décrire la formation de film conditionnant sur des surfaces exposées à l'eau de mer. C. Compère⁴¹ rapporte que des analyses XPS et Infrarouge rasant effectuées sur des échantillons d'aciers inoxydables immergés en eau de mer durant des périodes variables, montrent une adsorption préalable de protéines, suivie par des carbohydrates. Par ailleurs, en s'adsorbant sur le matériau, les molécules modifient ses propriétés de surface, ce qui conditionnera l'adhésion ultérieure des microorganismes⁴⁶.

Nichols et al.⁴⁷ ont suivi la formation de film conditionnant, à partir d'eau de mer filtrée, à la surface de cristaux de germanium, par spectroscopie IRTF-ATR. La même technique a été utilisée par Ishida et Griffiths⁴⁸ pour étudier l'adsorption/désorption d'alginate ou de dextrane à la surface de cristaux de germanium recouvert ou non de protéines, à différents pH. L'attachement des bactéries aux surfaces solides est non seulement facilité par les EPS, mais aussi est en plus fonction du film conditionnant présent sur la surface à coloniser. Ce dernier point est souvent controversé dans la littérature. Selon C. Rubio⁴⁹, l'adhésion des bactéries pionnières peut intervenir en même temps que se forme le film primaire. Apilanez et al.⁵⁰ considèrent que le film primaire est nécessaire mais ne détermine pas la croissance du biofilm.

De plus, selon les matériaux, la masse surfacique de la couche adsorbée varie. Elle atteint par exemple 0,8 mg/m² sur de l'acier inoxydable après 15 minutes d'exposition alors qu'elle atteindra 15 mg/m² sur du verre après quelques minutes⁵¹.

O'Toole et Kolter²⁷ ont montré, pour certaines souches de *P. fluorescens*, qu'un déficit en protéines extracellulaires conduit, par exemple, à une baisse de l'attachement de cette bactérie. Par ailleurs, des études réalisées par Williams et Fletcher⁵² sur des souches déficientes en antigène O, ont démontré une adhésion accrue de ces mutants sur des surfaces hydrophobes. Une absence de flagelles peut également induire une diminution de l'adhésion bactérienne aux surfaces⁴.

I - II.2.4. Paramètres affectant le détachement des biofilms

Le détachement d'un biofilm d'une surface peut être défini comme le retour à l'état planctonique de cellules adhérees. Bien que le processus de détachement soit

d'importance capitale, car il est à l'origine de dégradation de la qualité de l'eau du réseau de distribution, il reste le moins étudié.

Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes :

☞ *l'érosion* : de petites portions de biofilm se détachent sous l'effet de forces de cisaillement résultant du passage d'un fluide 'sur' le biofilm. Ce phénomène est considéré comme continu, le détachement de cellule isolée survenant sur l'ensemble de la surface du biofilm. Toutefois, comme l'ont montré Stewart et *al.*⁵³, l'érosion peut se traduire par la perte non pas d'une cellule mais d'amas cellulaires comportant des microorganismes de différentes tailles.

☞ *La desquamation* : contrairement à l'érosion, la desquamation fait référence à un détachement rapide de parties massives de biofilm, sur l'ensemble du biofilm, et dont la fréquence est aléatoire. Il intervient notamment lorsque le biofilm est âgé ou bien lorsque les conditions du milieu changent. Les biofilms ayant poussé sur des milieux riches, ou n'ayant pas été contraints à des forces de cisaillement importantes, sont particulièrement sensibles à ce mode de détachement. De plus, la surexpression de gènes codant pour certaines enzymes (lyase) ainsi que la perte d'EPS influencent le détachement de bactéries adhérees^{54 25}. En 1976, Howell et Atkinson⁵⁵ furent les premiers à modéliser le détachement du biofilm par desquamation en prenant comme hypothèse une limitation en dioxygène à la base du biofilm. D'autres études l'ont modélisé en se fondant sur une limitation en nutriments^{56,57}.

☞ *L'abrasion* : intervient lors de collisions entre les particules ce qui entraîne une perte de biomasse attachée.

☞ *La prédation* : le biofilm sert de nourriture à des protozoaires, des escargots, des insectes.... Dans cette forme de 'détachement' les cellules ne retournent pas dans le milieu liquide extérieur au contact du biofilm.

I - III. Les biofilms et l'eau du réseau de distribution : qualité microbienne de l'eau du réseau

Le réseau de distribution d'eau est souvent décrit comme un réacteur dans lequel l'eau et les canalisations sont le siège de réactions chimiques et biologiques. Du fait de multiples facteurs comme la longueur des tuyaux entre la source et le robinet du consommateur (Schéma I- 1), et / ou le temps de résidence de l'eau dans les canalisations et les réservoirs, la qualité de l'eau peut s'altérer au cours de son transport.

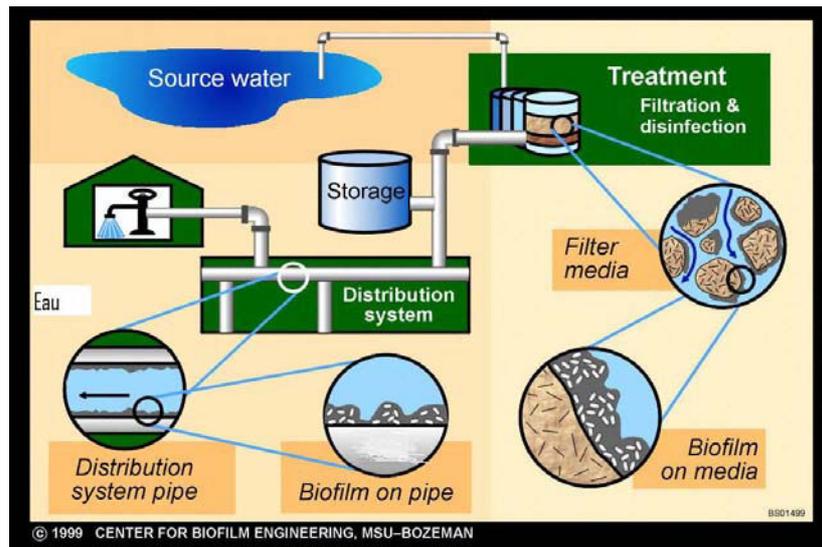


Schéma I- 1 : Parcours de l'eau depuis la source jusqu'au robinet du consommateur ⁵⁸

On distingue, en général, deux grandes catégories de pollution des eaux : les pollutions d'origine physico-chimique et celles d'origine microbiologique.

Les exigences de qualité actuellement en vigueur en France sont fixées par le code de la santé publique dans son annexe 13-I et sont de deux types. Il existe :

- les limites de qualité qui portent sur des paramètres qui, lorsqu'ils sont présents dans l'eau, sont susceptibles de générer des effets immédiats ou à plus long terme pour la santé. En ce qui concerne les paramètres microbiologiques, la stratégie de contrôle actuelle repose sur la recherche de bactéries dites « germes témoins de contamination fécale » (*Escherichia coli* et des entérocoques), faciles à détecter, non directement pathogènes, mais dont la présence laisse supposer l'existence de germes pathogènes pour l'homme. La qualité physico-chimique de l'eau est, quant à elle, évaluée par le nombre et la quantité de nitrates, pesticides, certains métaux et solvants chlorés, les sous-produits de la désinfection de l'eau présents.

- les références de qualité qui concernent les substances sans incidence directe sur la santé aux teneurs habituellement observées dans l'eau mais qui peuvent mettre en évidence une présence importante d'un paramètre au niveau de la ressource et / ou un dysfonctionnement des stations de traitement⁵⁹.

I - III.1. Exemples de dégradation microbiologique de l'eau du réseau

Lorsque des conditions nutritives et physico-chimiques favorables à la croissance sont réunies, les microorganismes, résidant à l'intérieur des canalisations d'eau du réseau, peuvent se développer et survivre en s'organisant sous forme de biofilms. Il peut y avoir par exemple une augmentation du nombre de *Salmonella*, d'*Escherichia*, de *Légionella*, de *Shigella*,... Des virus, particulièrement résistants aux traitements de désinfections tels que les Poliovirus, les Coxsackie virus, les Corona virus, Rotavirus peuvent également se retrouver dans l'eau. De nombreux parasites tels que *Giardia lamblia* ou *Cryptosporidium parvum* sont aussi à l'origine de troubles sanitaires⁶⁰.

Par ailleurs, les interventions sur le réseau (réparations, branchements), les fuites ou les cassures peuvent être responsables de l'introduction de microorganismes à l'intérieur du réseau. Westrell et al.⁶¹ soulignent, dans une étude réalisée en 2003, qu'un traitement des eaux défaillant s'avère être la cause majeure de la présence de pathogènes dans l'eau du réseau de distribution.

La présence de biofilms ou d'incrustations qui abritent des espèces variées de microorganismes a fait l'objet de nombreux travaux réalisés notamment par Van der Kooij et al.⁶², LeChevallier et al.⁶³. Les études les plus instructives sont celles qui révèlent la présence et la multiplication, le plus couramment sous forme de biofilm, d'espèces pathogènes et opportunistes telles que *Pseudomonas*⁶⁴⁻⁶⁶, *Mycobacter*^{67,68} *Campylobacter*⁶⁹, *Aeromonas*⁷⁰, *Legionella spp.*⁷¹⁻⁷³ et *Salmonella typhimurium*^{74,75}.

I - III.2. Relation entre la qualité microbiologique de l'eau ingérée et la santé des consommateurs

Des études épidémiologiques réalisées par Payment et al.⁷⁶ (1991 à 1997) au Canada, Zmirou et al.⁷⁷ (1986 à 2001) en France, Hellard et al. (2001)⁷⁸ en Australie ont établi un lien entre la qualité microbiologique de l'eau ingérée et la santé des consommateurs. Leurs études ont révélé que 0,2 cas de maladies gastro-intestinales par an et par personne sont recensés, parmi lesquels 10 à 30% sont associés à une consommation d'eau potable.

Parmi les crises les plus graves, on citera les épidémies causées par :

- *Cryptosporidium parvum*, un parasite, à Millwaukee (Wisconsin, Etats-Unis, 1993). Sur les 400 000 habitants touchés, plus de 60 sont morts.

- *Escherichia coli* O157 : H7 à Walkerton (Ontario, Canada, 2000). Sur les 2300 personnes impliquées, 6 sont décédées⁷⁹.

Les différentes crises sanitaires ayant fait suite à la consommation d'eau du réseau ont incité les fournisseurs d'eau potable à contrôler en continu sa biostabilité.

I - IV. Biostabilité de l'eau du réseau

I - IV.1. Définition de la biostabilité

Rittmann et Snoeyink⁸⁰ ont défini la stabilité biologique de l'eau comme son incapacité ou celle du matériau en contact avec elle, d'être à l'origine de la croissance microbienne, en l'absence de désinfectant. Elle dépend selon Liu et *al.*⁸¹, et Escobar et *al.*⁸², de la concentration en désinfectant résiduelle et en substrat ou nutriments permettant la croissance des microorganismes.

I - IV.2. Facteurs de la croissance bactérienne

Parmi les études réalisées par LeChevallier et *al.*⁶³ et Van der Kooij,⁸³ l'augmentation du nombre de bactéries totales, hétérotrophes et coliformes est fonction du temps de résidence des microorganismes dans le réseau de distribution ainsi que de la quantité de matière organique biodégradable présente.

Intéressons-nous aux principales sources nutritives mises en jeu.

I - IV.2.1. Le carbone

Le carbone organique est la source nutritive la plus utilisée (10 fois plus que l'azote et 100 fois plus que le phosphore) par les bactéries hétérotrophes pour la production de nouveau matériel cellulaire (assimilation) et en tant que source d'énergie. La plupart des composés organiques présents dans le réseau d'eau de distribution sont d'origine naturelle car ils proviennent de la végétation. Parmi eux, on note la présence d'acides humiques, fulviques, de carbohydrates polymériques, de protéines et d'acides carboxyliques⁸⁴.

La quantité de carbone présente dans l'eau du réseau est mesurée de trois façons : le COT (carbone organique total), le COD (carbone organique dissous) et le COA (carbone organique assimilable). Le COT représente la quantité totale de composés carbonés solubles et insolubles présents dans l'eau. Le COD est, quant à lui, la fraction soluble du

COT. Le COA est la fraction du COD pouvant être assimilée par les organismes pour leur croissance.

Bien que le carbone soit généralement considéré comme une des sources les plus limitatives en ce qui concerne la croissance bactérienne, d'autres nutriments tels que l'azote ou le phosphore⁸⁵ jouent un rôle important.

I - IV.2.2. L'azote et le phosphore

L'azote est utilisé par les microorganismes pour synthétiser les acides aminés et le matériel génétique.

Le phosphore est également un nutriment essentiel pour les microorganismes car il est présent dans les cellules. La majeure partie du phosphore se retrouve dans l'ADN, ARN et les lipides : ceci représente environ 60% du phosphore total des cellules. L'autre partie est sous forme de phosphates et polyphosphates⁸⁶.

I - IV.2.3. Autres sources de nutriments

En complément au carbone, à l'azote et au phosphore, d'autres 'nutriments' tels que le soufre, le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le fer, les oligo-éléments et les vitamines sont également essentiels. Cependant, Miettinen et *al.*⁸⁷ ont montré qu'ils ne limitent pas la croissance des bactéries hétérotrophes dans les eaux du réseau.

I - IV.3. Méthodes d'évaluation de la croissance bactérienne à l'intérieur des systèmes d'eau du réseau de distribution

I - IV.3.1. Méthodes standard

Bien que la croissance des microorganismes à l'intérieur d'un système d'eau du réseau soit fonction de divers facteurs tels que la température, le pH, la quantité et la nature de nutriments disponibles, le carbone organique assimilable (COA) ou le carbone organique dissous biodégradable (CODB) sont généralement considérés comme les principaux^{83,83,88-90}.

☞ *Mesure du COA*

La mesure de la quantité de carbone organique assimilable a été réalisée pour la première fois en se basant sur une méthode décrite par van der Kooij en 1978. Il s'agit actuellement de la méthode de choix pour déterminer la qualité générale de l'eau dans les systèmes de distribution⁹¹. Les critères européens pour assurer une eau saine fixent la limite à 100 bactéries/mL.

Elle est basée sur l'utilisation d'un échantillon d'eau contenant une grande variété de microorganismes (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* sp. NOX, *Flavobacterium* sp. S12, *Klebsiella pneumonia* CF17) dont la croissance est suivie^{23,89}. Le rendement maximum de croissance est déterminé et comparé à des coefficients de croissance connus en fonction de la quantité de carbone. Cette méthode est laborieuse et de nombreuses précautions doivent être mises en œuvre afin de ne pas amener de contamination extérieure, ce qui pourrait fausser la quantité de carbone calculée. Elle nécessite entre 5 et 14 jours d'analyse.

☞ *Mesure de la CODB*

Cette méthode fut la première fois présentée en 1987 par Servais et al.⁹². Elle repose sur la minéralisation du carbone organique par les microorganismes. Expérimentalement, un faible volume d'inoculum bactérien est ajouté à l'échantillon filtré soumis à l'essai. Le carbone organique de l'échantillon est mesuré au début et à la fin de l'essai (après un période d'incubation de 28 jours). La quantité de CODB est obtenue par différence entre ces deux quantités de carbone organique dissous.

A l'heure actuelle, le COD est analysé en ayant recours à la méthode standard 5310B²⁴.

☞ *Numération sur boîtes des hétérotrophes (heterotrophic plate counts: HPC)*

Les bactéries hétérotrophes, que l'on retrouve au niveau des systèmes d'approvisionnement en eau potable, sont des microorganismes qui utilisent des composés organiques pour tirer la majeure partie ou la totalité du carbone dont ils ont besoin. La technique HPC est une méthode d'analyse microbienne qui utilise la formation de colonies dans des milieux de culture pour calculer les concentrations de flore hétérotrophe. Une augmentation des HPC peut indiquer la survenue d'un problème au niveau du traitement, ou bien une contamination postérieure au traitement, ou bien encore

un détachement de la biomasse fixée sur les parois des canalisations. Cette méthode ne donne toutefois pas d'indication sur les types d'organismes présents⁹¹.

Les méthodes microbiologiques classiques (étalement de l'échantillon sur milieux gélosés) de détermination de la viabilité bactérienne⁹³ présentent de nombreux inconvénients. Parmi eux, on notera que ces méthodes sont longues, fastidieuses, ne donnent pas de réponses précises, et ne permettent pas de détecter des formes bactériennes viables non cultivables (VNC). Mc Feters et *al.*⁹⁴ rapportent que les coliformes endommagés ne sont quasiment pas détectés ce qui rejoint les études menées par Stewart et *al.*⁹⁵ qui ont noté que les résultats obtenus surestiment l'efficacité des désinfectants. De plus, ces méthodes ne rendent pas compte de la diversité de la population microbienne présente à l'intérieur d'un échantillon d'eau du réseau.

I - IV.3.2. Méthodes basées sur la biologie moléculaire

Des méthodes plus sophistiquées que celles décrites précédemment, basées sur la biologie moléculaire, existent et permettent une détection spécifique et rapide en évitant des étapes de culture. La majorité de ces techniques reposent sur une amplification afin d'augmenter la sensibilité. Il s'agit notamment des techniques immunologiques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR)⁹⁶, et d'hybridation *in situ* (FISH)^{97,98}.

☞ *La technique PCR*

La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consiste à amplifier *in vitro* un fragment d'ADN pour en faciliter la détection. Cette amplification est réalisée en introduisant des séquences primaires complémentaires et spécifiques de la chaîne d'ADN à amplifier.

Cette technique permet de détecter la flore bactérienne totale, active et morte, à des concentrations plus faibles qu'en ayant recours aux méthodologies par culture ou par marquage à l'aide d'anticorps fluorescents⁹⁹. La PCR possède un fort pouvoir discriminant grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques¹⁰⁰.

Dans le but d'établir une corrélation entre la viabilité cellulaire et la présence d'ADN, ceci implique une dégradation rapide de l'ADN après la mort cellulaire. Or, Romanowski *et al.*¹⁰¹ ont montré que l'ADN pouvait persister longtemps après la mort cellulaire, c'est pourquoi il est plus courant de se tourner vers l'ARN qui présente l'avantage d'être plus

facilement dégradé¹⁰². Les méthodes basées sur l'utilisation de l'ARN sont appelées RT-PCR, méthode NASBA¹⁰³ et permettent la détection d'entérovirus^{104,105}.

☞ La méthode FISH

La technique d'hybridation *in situ* repose sur l'une des propriétés physico-chimiques des acides nucléiques : la complémentarité des quatre bases constitutives de l'ADN (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine) et de l'ARN (A U G C). L'objectif de l'hybridation est de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique (qui est la cible) au sein de la cellule par association avec une sonde oligonucléotidique de séquence complémentaire. La sonde est marquée par un fluorochrome permettant sa détection au microscope à épifluorescence.

Les avantages des techniques de microbiologie moléculaire sont nombreux :

- obtention de données quantitatives en 1 jour,
- suppression des cultures bactériennes et du comptage
- analyse *in situ*
- appréciation de la viabilité des cellules
- bonne spécificité¹⁰⁶

Toutefois, l'inhibition possible du signal d'amplification de l'ADN par des composés présents dans la matrice de l'échantillon (PCR), ou bien la différence d'état physiologique entre les cellules d'un même échantillon compliquent leur utilisation. A ces désavantages s'ajoutent la complexité de leur mise en œuvre ainsi qu'un coût onéreux.

A ces méthodes, peuvent s'ajouter les puces à ADN développées par Ye et *al.*¹⁰⁷, les sondes PNA décrites par Stender et *al.*¹⁰⁸, Lehtola et *al.*¹⁰⁹, Wilks et Keevil¹¹⁰ et les méthodes d'hybridation directe¹¹¹.

I - IV.3.3. Mesure de la vitesse de formation du biofilm (BFR)

Contrairement aux méthodes précédemment évoquées, la méthode BFR ne repose pas sur un dénombrement cellulaire mais sur la vitesse de formation d'un biofilm dans des conditions expérimentales déterminées. Le système expérimental se compose d'une colonne en verre sur laquelle se trouvent des coupons en verre. Il est exposé à l'eau à tester qui possède un débit de 0,2 m/s. Les coupons sont régulièrement prélevés et des

mesures d'ATP (adénosine triphosphate) sont effectuées : le résultat s'exprime en pg ATP/cm² ¹¹². Afin d'obtenir une corrélation entre le BFR et la concentration en carbone présente dans l'eau testée, le système peut être calibré en ajoutant des quantités connues d'acétate dans l'eau. Par exemple, van der Kooij et *al.* ¹¹² ont établi qu'une valeur de BFR de 35 pg ATP/cm² par jour correspondait à 1 µg de carbone / litre.

I - V. Méthodes de détection des biofilms

Il existe un grand nombre de méthodes microscopiques capables de fournir des informations concernant la composition des biofilms. On peut citer parmi elles la microscopie électronique à balayage (MEB), électronique à transmission (MET), confocale ¹¹³ et à épifluorescence.

☞ La microscopie électronique à transmission (MET)

Cette technique permet d'examiner la morphologie, la disposition ainsi que l'ultrastructure cellulaire ¹¹⁴⁻¹¹⁶. La visualisation de certains composants des biofilms tels que les EPS est rendue possible par l'utilisation couplée de colorants spécifiques.

☞ La microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette microscopie permet, quant à elle, d'obtenir des informations concernant la structure de surface des biofilms, c'est-à-dire la disposition des cellules ^{117,118}. Le grossissement des microscopes à balayage actuels varient de 5 à 300 000 fois.

La présence d'EPS se devine sous l'apparence d'un 'nuage' entourant les cellules ¹¹⁹.

Le problème majeur de ces deux techniques reste la préparation de l'échantillon et notamment sa déshydratation qui peut conduire à la perte de certains appendices comme les pili. Elles ne permettent pas d'observer, en continu, des phénomènes dynamiques. A l'heure actuelle, afin de limiter ces problèmes, les biofilms analysés sont préparés à l'aide de nouvelles techniques de préparation, dites de cryo-fixation.

☞ La microscopie confocale

Elle fournit des images d'un biofilm en provenance de différents plans focaux. En les assemblant, il est possible de reconstituer une structure en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respectives de 0,15 µm et 0,58 µm pour un objectif ayant une

ouverture numérique de 1,4 et l'utilisation d'une longueur d'onde de 500 nm¹²⁰. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des biofilms en milieu aqueux¹¹³.

Lorsque le microscope confocal utilisé dispose de plusieurs lasers, il est possible de marquer simultanément les différentes couches composant le biofilm à l'aide de sondes fluorescentes différentes.

☞ La microscopie à épifluorescence

Elle repose sur la propriété qu'ont certains chromophores lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde, de réémettre l'énergie fournie sous forme lumineuse à une longueur d'onde supérieure. La fluorescence réémise a une durée de vie plus ou moins longue et selon les marqueurs, le chromophore va se fixer directement sur la cible. Certains colorants permettront, par exemple, d'effectuer une distinction entre les cellules vivantes et les cellules mortes¹²¹.

Le problème majeur de ces techniques réside dans la préparation de l'échantillon (déshydratation, marquage) qui entraîne une destruction du matériel. Pour une description plus détaillée des différentes méthodes optiques, spectroscopiques et microscopiques, le lecteur pourra se référer, entre autres, aux revues de Wolf et *al.*¹²² et Nivens et *al.*¹²³.

I - V.1. Les méthodes électrochimiques

Ces quinze dernières années, des microélectrodes ont été utilisées en écologie microbienne¹²⁴ et permettent de mesurer la concentration en dioxygène, le pH, ainsi que des potentiels rédox. D'un diamètre de 2 à 100 µm, elles possèdent une très forte résolution spatiale qui autorise le suivi des micro-variations dans des environnements tels que les biofilms¹²⁵⁻¹²⁸.

La voltampérométrie cyclique permet également de détecter la présence et le suivi de l'activité physiologique des microorganismes¹²⁹. Les électrodes sont mises en contact de la phase aqueuse et détectent les changements de potentiel, s'ils existent, suite à l'application d'une tension ou d'un courant.

La spectroscopie diélectrique et la spectroscopie d'impédance électrochimique^{130,131} considèrent que les microorganismes se comportent comme des condensateurs électriques accumulant des charges électriques lorsqu'ils sont soumis à des champs

électriques alternatifs. Un système électronique convertit l'information de capacitance obtenue en un signal analogique. Des capteurs très précis peuvent être réalisés (jusqu'à une résolution de 10 Å) et peuvent être insérés sur la surface plate de cellule à circulation. Habituellement, les techniques électrochimiques sont utiles pour le suivi de la biocorrosion¹³² causée par l'établissement de biofilms à la surface de métaux. De plus amples indications concernant les différentes méthodes électrochimiques utilisées pour le suivi des biofilms sont relatées, par exemple, par Nivens et *al.*¹²³.

I - V.2. Les méthodes basées sur la fluorescence

Le capteur de fluorescence (FlusS), testé par l'équipe de H.C. Flemming (Muelheim, Allemagne), détecte l'autofluorescence des biomolécules telles que les acides aminés et / ou l'ATP. Ce capteur a pour avantage de détecter le matériel biologique se trouvant parmi les dépôts, et notamment de pouvoir différencier les cellules mortes des cellules vivantes survivant après désinfection. Toutefois, les premiers résultats ont montré que la détection d'un signal d'autofluorescence spécifique aux biomolécules est délicate du fait d'une part du faible signal émis et d'autre part, de l'autofluorescence émise par d'autres molécules telles que les acides humiques.

Devant la prolifération des cyanobactéries qui contiennent une quantité importante de toxines, des recherches ont été effectuées visant à comprendre leur mécanisme de prolifération. A ce propos, on citera les travaux réalisés en 2002 par Leboulanger et *al.*¹³³ qui ont mis au point une sonde fluorescente permettant d'établir une cartographie (répartition) de cyanobactéries toxiques et filamenteuses *Planktothrix rubescens* se développant dans des lacs.

I - V.3. Autres méthodes

Trois autres types de capteurs, développés et testés dans le cadre du contrat SAFER, seront explicités dans ce paragraphe : le nanovibrateur, le capteur à fibre optique (FOS) et le capteur de turbidité.

☞ Le nanovibrateur encore appelé MSS Mechatronic Surface Sensor (Brevet n°103 344, Portugal)¹³⁴ utilise le principe des vibrations pour détecter et mesurer, en ligne, la formation et/ou le détachement de salissures.

Le dispositif comporte un actuateur piézoélectrique ainsi qu'un capteur de vibrations fixés sur une surface en PVC, à l'intérieur d'une cellule à circulation. L'actuateur produit une vibration, dépendant de la masse et des propriétés physiques du dépôt. Elle se propage ensuite le long de la surface en PVC pour être mesurée par le capteur. En analysant mathématiquement le signal obtenu, il est possible d'évaluer l'épaisseur du biofilm.

☞ Le principe du capteur FOS (Fiber Optical Sensor)¹³⁵ repose sur la diffusion de la lumière par les dépôts adhérents à l'extrémité d'une fibre optique. La lumière rétrodiffusée arrive à un détecteur et l'épaisseur d'un biofilm sur les parois internes des canalisations d'eau du réseau peut être ainsi mesurée. En prélevant le biofilm, il est possible de procéder à un comptage des cellules adhérentes et d'établir une corrélation entre, par exemple la quantité de matière organique biodégradable présente dans l'eau, le signal enregistré, et le nombre de cellules totales.

☞ Le capteur DTM (Differential Turbidity Measurement)¹³⁶ est un système de mesure optique consistant en deux cellules de mesure (une paire de fenêtres optiques). Une fenêtre est nettoyée d'une manière continue afin d'éviter l'établissement de biofilms. Les salissures se déposent ainsi sur l'autre fenêtre et leur signal peut directement être obtenu en soustrayant le signal dû à la fenêtre propre.

Un tel système permet de déterminer la position des dépôts en surface. Toutefois, pas de distinction possible concernant la nature des dépôts. Ayant une trop faible sensibilité, il ne peut être utilisé pour analyser les dépôts se formant à l'intérieur des canalisations d'eau du réseau de distribution. Il sera plus approprié pour la détection de composés provenant d'une eau très polluée telle que celle rejetée par les papeteries.

I - V.4. Applications de la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR)

Il s'agit probablement de la technique la plus utilisée en tant qu'outil de caractérisation d'échantillons biologiques de nature variée^{47 137}. Les macromolécules biologiques ainsi que des systèmes biologiques complexes comme les tissus ou les cellules¹³⁸ sont ainsi souvent étudiés par cette méthode. Elle présente les avantages de suivre les changements chimiques ayant lieu au niveau de l'interface cristal/solution, sur une épaisseur d'environ 1 μm , *in situ*, de manière non destructive et en temps réel. Contrairement à la plupart des méthodes d'analyse des biofilms, aucune préparation de

l'échantillon n'est requise. Une restitution parfaite des propriétés des échantillons bactériens est ainsi obtenue : les empreintes spectrales obtenues combinent les contributions des groupes fonctionnels présents dans toutes les molécules biochimiques de l'échantillon¹²³. L'équipe de Naumann¹³⁷ a mené des études approfondies sur les cellules bactériennes appartenant à différentes espèces et souches. Leurs travaux, couplés à des méthodes statistiques, ont montré que les spectres d'absorption IR étaient spécifiques aux cellules microbiennes et que chacune avait ses empreintes caractéristiques.

☞ Suivi de biofilms par IRTF-ATR

Le suivi de bandes d'absorption IR caractéristiques de la biomasse bactérienne telles que les protéines (bandes amides) offre l'avantage de suivre la dynamique de biofilms bactériens¹³⁹⁻¹⁴¹. De plus, grâce à la spectroscopie IRTF-ATR^{142,143}, il est possible d'opérer une distinction entre les dépôts organiques et inorganiques des biofilms^{136,144}. Parmi les montages expérimentaux utilisés pour suivre la formation et l'évolution de biofilms, le plus courant repose sur l'utilisation d'une cellule à circulation. Nivens et *al.*¹²³ ou Schmitt et *al.*¹⁴⁴ ont conçu des montages permettant de suivre le développement de trois biofilms simultanément, ce qui économise un temps précieux d'une part et permet la reproductibilité de la mesure d'autre part. Nivens et *al.*¹⁴⁵ ont obtenu des spectres bactériens à la surface de cristaux de germanium par spectroscopie IRTF/ATR et ont montré que les bandes amides des protéines, les bandes esters de stockage de produits comme le poly- β -hydroxyalkanoate (PHA), et les élongations C-O du matériel extracellulaire polymérique (les polysaccharides) rendent compte de l'état physiologique des microorganismes présents dans le biofilm. Comme l'ont montré Suci et *al.*¹⁴⁶ le couplage entre l'IRTF-ATR et la microscopie optique facilite la compréhension des empreintes spectrales IR obtenues.

D'autres utilisations telles que le suivi de la biocorrosion, les applications cliniques (la pénétration d'antibiotiques à l'intérieur des biofilms¹⁴⁷), et l'efficacité des désinfectants envers les biofilms d'espèces pathogènes telles que *Candida albicans*¹⁴⁸ suscitent l'intérêt des chercheurs.

Une description détaillée du principe de l'ATR est proposée au chapitre II.

Références bibliographiques du chapitre I

1. Palleroni N.J. Bergey's Manual of Systematic Biology. Kreig N.R. & Holt J.G. (eds.), pp. 141-199 (The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984).
2. Larpent J.-P. & Larpent-Gourgaud M. Mémento technique de microbiologie. Tec&Doc Lavoisier (ed.), pp. 255-647 (1997).
3. Compeau G., Al-Achi B.J., Platsouka E. & Levy S.B. Survival of rifampicin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2432-2438 (1988).
4. DeFlaun M.F., Tanzer A.S., McAteer A.L., Marshall B. & Levy S.B. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 112-119 (1990).
5. Piette J.P. & Idziak E.S. A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2783-2791 (1992).
6. Scott J. *et al.* A fatal transfusion reaction associated with blood contaminated with *Pseudomonas fluorescens*. *Vox Sanguinis* **54**, 201-204 (1988).
7. Osawa K., Nakajima M., Katakoa N., Arakawa S. & Kamidono S. Evaluation of antibacterial efficacy of drugs for urinary tract infections by genotyping based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Journal of Infection and Chemotherapy* **8**, 353-357 (2002).
8. Picot L. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes and Infection* **3**, 985-995 (2001).
9. Puckett A., Davison G., Entwistle C.C. & Barbara J.A. Post transfusion septicaemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. *Journal of Clinical Pathology* **45**, 155-157 (1992).
10. Burgos F., Torres A., Gonzalez J., Puiz de la Bellacasa J. & Rodriguez-Roisin R. Bacterial colonization as a potential source of nosocomial respiratory infections in two types of spirometer. *European Respiratory Journal* **9**, 2612-2617 (1996).
11. O'Sullivan D.B. & O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Review* **56**, 662-676 (1992).
12. Snissi A., Hamdoun S., Roussi Hassani B. & Airini K.L. Utilisation des *Pseudomonas fluorescens* dans la bioprotection de la plante de la tomate contre *Fusarium oxysporum*. (Journées Nationales de

Microbiologie).2005.**Oujda**.

13. Larpent J.-P. & Larpent-Gourgaud M. Mémento technique de microbiologie. Tec&Doc Lavoisier (ed.), pp. 753-877 (1997).
14. Yanze-Kontchou C. & Gschwind N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4297-4302 (1994).
15. Mandelbaum R.T., Allan D.L. & Wackett L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1451-1457 (1995).
16. Falla J. & Block J.-C. Binding of cadmium, nickel, copper, and zinc by isolated envelopes of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters* **108**, 347-352 (1993).
17. Ribas F., Perramon J., Terradillos A., Frias J. & Lucena F. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 704-710. 2000.
18. Ivanova E.P. *et al.* *Pseudomonas extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 2113-2120 (2002).
19. Van der Kooij D. Characterization and classification of fluorescent pseudomonads isolated from tap water and surface water. *Antonie van Leeuwenhoek* **45**, 225-240 (1979).
20. Van der Kooij D. The occurrence of *Pseudomonas* spp. in surface water and in tap water as determined on citrate media. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**, 187-197 (1977).
21. Rhodes M.E. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 221-263 (1959).
22. Stanier, Palleroni & Doudoroff. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966).
23. Van der Kooij D., Visser A. & Oranje J.P. Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentrations in tap water. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**, 229-243 (1982).
24. APHA, AWWA & WEF (American Public Health Association - American Water Works Association - Water Environment Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C. (1998).
25. Allison, D.G., Ruiz, B., Sanjose, C., Jaspe, A. & Gilbert, P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 179-184 (1998).

26. Korber, D.R., Lawrence J.R. & Caldwell, D.E. Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1421-1429 (1994).
27. O'Toole, G.A. & Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**, 449-461 (1998).
28. Larpent J.-P. & Larpent-Gourgaud M. Mémento technique de microbiologie., pp. 109-173 Paris, (1997).
29. Prescott L., Harley J.P. & Klein D. Microbiologie. DeBoeck Université (ed.), pp. 40-69 Bruxelles, (1995).
30. Falla J.A., Bauda P. & Block J.C. Isolation of cell envelope layers of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Microbiological Methods* **7**, 285-294 (1988).
31. Leclerc H. Microbiologie générale - La bactérie et le monde bactérien. Doin (ed.), pp. 47-116 Paris (1995).
32. Buchanan R.E. Life phases in a bacterial culture. *Journal of Infectious Diseases* **23**, 109-125 (1918).
33. Costerton J.W. Introduction to biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **11**, 217-221 (1999).
34. Zobell C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* **46**, 39-56 (1943).
35. Marshall K.C. Interfaces in microbial ecology. Cambridge MA (1976).
36. Flemming H.-C., Neu T.R. & Wozniak D. The EPS matrix: The 'house of biofilm cells'. *Journal of Bacteriology* 1-6 (2007).
37. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9 (2001).
38. Fletcher M. & Pringle J.H. Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1321-1325 (1986).
39. O'Toole G.A. & Kolter R. Flagella and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295-304 (1998).
40. Stanley P.M. Factors affecting irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 1493-1499 (1983).
41. Compère C. Biofilms en milieu marin. *Techniques Sciences Méthodes* **11**, 48-54 (1999).

42. Goodman A.E., Marshall K.C. & Hermansson M. Gene transfer among bacteria under conditions of nutrient depletion in simulated and natural aquatic environments. *FEMS Microbiological Ecology* **15**, 55-60 (1994).
43. Moller S., Sternberg C., Andersen J.B., Christensen B.B. & Ramos J.L. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 721-732 (1998).
44. Keevil C.W. & Walker J.T. Normarski DIC microscopy and image analysis of biofilms. *BINARY* **4**, 93-95 (1992).
45. Loeb G.I. & Neihof R.A. Marine conditioning films. *Advances in Chemistry* **145**, 319-335 (1975).
46. Trulear M.G. & Characklis W.G. Dynamics of biofilm processes. *Journal of Water Pollution Control Federation* **54**, 1288-1301 (1982).
47. Nichols, P.D., Henson, J.M., Guckert, J.B., Nivens, D.E. & White, D.C. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **4**, 79-94 (1985).
48. Ishida, K.P. & Griffiths, P.R. Investigation of polysaccharide adsorption on protein conditioning films by Attenuated Total Reflection infrared spectrometry. I. Germanium surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **160**, 190-200 (1993).
49. Rubio C. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. 1-214. 2002. Université Paris VI. Ref Type: Thesis/Dissertation
50. Apilanez I., Gutierrez A. & Diaz M. Effects of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology* **66**, 225-230 (1998).
51. Characklis W.G. Biofilms. Characklis W.G. & Marshall K.C. (eds.), pp. 195-233 (John Wiley & Sons, New York, 2000).
52. Williams V. & Fletcher M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 100-104 (1996).
53. Stewart P.S., Peyton B.M., Drury W.J. & Murga R. Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 327 (1993).
54. Boyd A. & Chakrabarty A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2355-2359 (1994).
55. Howell J.A. & Atkinson B. Sloughing of microbial film in trickling filters. *Water Research* **10**, 307 (1976).

56. Heukelelian H. & Crosby E.S. Slime formation in polluted waters. *Sewage Industrial Wastes* **28**, 78 (1956).
57. Heukelelian H & Crosby E.S. Slime formation in sewage. *Sewage Industrial Wastes* **28**, 206 (1956).
58. Camper A. & Dirckx P. Schematic of biofilm in water treatment and water distribution systems. http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library/Water/Full-image%20Pages/01499wb-jpg.htm (1999).
59. Direction générale de la Santé. La qualité de l'eau potable en France - Aspects sanitaires et réglementaires.1-43 (2005).
60. Barbeau B., Payment P., Coallier J., Clément B. & Prévost M. Evaluating the risk of infection from the presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. *Quantitative Microbiology* **2**, 37-54 (2000).
61. Westrell T., Bergstedt O., Stenstrom T.A. & Ashbolt N.J. A theoretical approach to assess microbial risks due to failures in drinking water systems. *International Journal of Environmental Health Research* **13**(2), 181-197 (2003).
62. Van der Kooij D. & Zoeteman BCJ. Water quality in distribution systems. 1978. Kyoto.
63. LeChevallier MW., Babcock TM & Lee RG. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2714-2724 (1987).
64. Martiny A.C., Jorgensen T.M., Albrechtsen H-J., Arvin E. & Molin S. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6899-6907 (2003).
65. Percival S.L., Knapp J.S., Wales D.S. & Edyvean R.G.J. Biofilm development in potable quality water. *Biofouling* **13**, 259-277 (1999).
66. Penna Vessoni T.C., Martins Silva A.M. & Mazzola P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification syst. *BMC public health* **2**, 1-11 (2002).
67. Norton C.D. & LeChevallier M.W. The survival of *Mycobacterium avium* complex in biofilms: a pilot study. American Water Works Association. 357-370. 1998. Belleville, IL, USA.
68. Dailloux M. *et al.* *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6946-6948 (2003).
69. Lehtola M.J., Pitkanen T., Miebach L. & Miettinen I.T. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Science and Technology* **54**, 57-61 (2006).

70. Van der Kooij D., Vrouwenvelder H.S., Veenendaal H.R. & Kiwa N.V. Kinetic aspects of biofilm formation on surfaces exposed to drinking water. *Water Science and Technology* 32(8), 61-65 (1995).
71. Van der Kooij D., Veenendaal H.R., Slaats N.P.G., Vonk D. & Kiwa N.V. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* on synthetic pipe materials in contact with treated water under static and dynamic conditions. 176-180 (2000). Ulm, Sweden. Internal Conference on *Legionella*.
72. Murga R. *et al.* Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121-3126 (2001).
73. Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V. & Keevil C.W. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1842-1851 (1994).
74. Armon R., Starosvetzky J., Arbel T. & Green M. Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. *Water Science and Technology* 35, 293-300 (1997).
75. Mackay W.G., Gribbon L.T., Barer M.R. & Reid D.C. Biofilms in drinking water systems - A possible reservoir for *Helicobacter pylori*. *Water Science and Technology* 38, 181-185 (1998).
76. Payment P. & Hartemann P. Les contaminants de l'eau et leurs effets sur la santé. *Revue des Sciences de l'Eau* 11, 199-210 (1998).
77. Zmirou D. *et al.* Quels risques pour notre santé? France (2000).
78. Hellard M.E., Sinclair M.I., Forbes A.B. & Fairley C.K. A randomized, blinded, controlled trial investigating the gastrointestinal health effects of drinking water quality. *Environmental Health Perspectives* 109, 773-778 (2001).
79. O'Connor D.R. A strategy for safe drinking water. Part II, 194-244. 2002. Ontario. Walkerton report.
80. Rittmann B.E. & Snoeyink V.L. Achieving biologically stable drinking water. *J. AWWA* 76, 106-114 (1984).
81. Liu W. *et al.* Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system. *Water Research* 36(4), 891-898 (2002).
82. Escobar C.I., Randall A. & Taylor J. Bacterial growth in distribution systems: effects of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology* 35(17), 3442-3447 (2001).
83. Van der Kooij D. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *Journal of AWWA* 84, 57-65 (1992).

84. Berger P.S., LeChevallier M.W. & Reasoner D.J. Seminar publication :Control of biofilm growth in drinking water distribution systems. EPA, (1992).
85. Lehtola M.J., Miettinen I.T. & Martikainen P.J. Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 494-499 (2002).
86. Valdstein O., Olsen L.M., Busch A., Andersen T. & Reinertsen H.R. Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited systems? A microcosm study. *FEMS Microbiology Ecology* **46**, 307-316 (2000).
87. Miettinen I.T., Vartiainen T. & Martikainen P.J. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3242-3245 (1997).
88. Van der Kooij D., Van Lieverloo J., Hein M., Schellart J. & Hiemstra P. Maintaining quality without a disinfectant residual. *Journal of AWWA* **91**, 55-64 (1999).
89. Van der Kooij D., Visser A. & Hijnen W.A.M. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *Journal of AWWA* **74**, 540-545 (1982).
90. Mathieu L. *et al.* Parameters governing bacterial growth in water distribution systems. *Revue des Sciences de l'Eau* **6**, 91-112 (1992).
91. WHO. Heterotrophic plate counts and drinking water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. IWA Publishing, Geneva (2003).
92. Servais P., Billen G. & Hascoet M-C. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Research* **21**, 445-450 (1987).
93. Yu F.P., Pyle B.H. & McFeters G.A. A direct viable count method for the enumeration of attached bacteria and assessment of biofilm disinfection. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 167-180 (1993).
94. Mc Feters G.A., Kippin J.S. & LeChevallier M.W. Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1-5 (1986).
95. Stewart P.S. *et al.* Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1690 (1994).
96. Hellyer T.J., Desjardin L.E., Hehman G.L., Cave M.D. & Eisenach K.D. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 290-295 (1999).
97. Chapman P.A., Ellin M., Ashton R. & Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation

- performed on naturally contaminated raw meat products. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 11-20 (2001).
98. Garcia-Armisen T. & Servais P. Enumeration of viable E.coli in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 269-279 (2004).
 99. Yamamoto H., Hashimoto Y. & Ezaki T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiological Ecology* **20**, 149-154 (1996).
 100. Palmer C.J., Bonilla G.F. & Roll B. Detection of Legionelle species in reclaimed water and air with the Enviroamp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 407-412 (1995).
 101. Romanowski G., Lorentz M.G., Saylor G. & Wackernagel W. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3012-3019 (1992).
 102. McKillip J.L., Jaykus L.A. & Drake M. Nucleic acid persistence in heat-killed Escherichia coli O157:H7 from contaminated skim milk. *Journal of Food Protection* **62**, 839-844 (1999).
 103. Birch L., Dawson C.E., Cornett J.H. & Keer J.T. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 296 (2001).
 104. Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y. & Schwartzbrod L. Enterovirus detection from wastewater by RT-PCR and cell culture. *Water Science and Technology* **40**, 105-109 (1999).
 105. Monpoeho S. *et al.* Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2484-2488 (2001).
 106. Buchbinder S., Trebesius K. & Heesemann J. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *International Journal of Medical Microbiology* **292**, 241-245 (2002).
 107. Ye R.W., Wang T., Bedzyk L. & Croker K.M. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods* **47**, 257-272 (2001).
 108. Stender H., Fiandaca M., Hyldig-Nielsen J.J. & Coull J. PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods* **48**, 1-17 (2002).
 109. Lehtola M.J., Torvinen E., Miettinen I.T. & Keevil C.W. Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in potable-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 848-853 (2006).

110. Wilks S.A. & Keevil C.W. Targeting species-specific low affinity 16S rRNA binding sites by using peptide nucleic acids for detection of Legionellae in biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5453-5462 (2006).
111. Meijer A., Roholl P.J., Gielis-Proper S.K., Meulenbergh Y.F. & Ossewaarde J.M. Chlamydiae pneumoniae in vitro and in vivo; a critical evaluation of in situ detection methods. *Journal of Clinical Pathology* **53**, 904-910 (2000).
112. Van der Kooij D. Biological stability: a multidimensional quality aspect of treated water. *Water, Air, & Soil Pollution* **123**, 25-34 (2000).
113. Lawrence, J.R. & Neu, T.R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods in Enzymology* **310**, 131-144 (1999).
114. Lawrence J.R. *et al.* Scanning transmission X-Ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5543-5554 (2003).
115. Graham L.L., Harris R., Villiger W. & Beveridge T.J. Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *Journal of Bacteriology* **173**, 1623-1633 (1991).
116. Korenevsky A.A., Vinogradov E., Gorby Y. & Beveridge T.J. Characterization of the lipopolysaccharides and capsules of *Shewanella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4653-4657 (2002).
117. Marrie T.J., Noble M.A. & Costerton J.W. Examination of the morphology of bacteria adhering to intraperitoneal dialysis catheters by scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Clinical Microbiology* **18**, 1388-1398 (1983).
118. Videla H.A., de Mele M.F.L. & Brankevich G. Assessment of corrosion and microfouling of several metals in polluted seawater. *Corrosion* **44**, 423-426 (1988).
119. Ginn T.R. *et al.* Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Advances in Water Resources* **25**, 1017-1042 (2002).
120. Stelzer E.H.K. & Lindek S. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Optics Communications* **111**, 536-547 (1994).
121. Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. & Desjardins R. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 77-86 (1999).
122. Wojf G., Crespo J.G. & Reis M.A.M. Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring. *Environmental Science & Bio/Technology* **1**, 227-251 (2002).

123. Nivens,D., Palmer,R.J.J. & White,D.C. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology* **15**, 263-276 (1995).
124. Amann R. & Kuhl M. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology* **1**, 352-358 (1998).
125. Tribollet B. Electrochemical sensors for biofilm and biocorrosion. *Materials and Corrosion* **54**, 527-534 (2003).
126. Santegoeds C.M., Schramm A. & de Beer D. Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation* **9**, 159-167 (1998).
127. Okabe S., Satoh H. & Watanabe Y. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3182-3191 (1999).
128. Herbert-Guillou,D., Tribollet,B., Festy,D. & Ki  n  ,L. In situ detection and characterization of biofilm in waters by electrochemical methods. *Electrochimica Acta* **45**, 1067-1075 (1999).
129. Giao M.S., Montenegro M.I. & Vieira M.J. Monitoring biofilm formation by using cyclic voltammetry-effect of the experimental conditions on biofilm removal and activity. *Water Science and Technology* **47**, 51-56 (2003).
130. Yang L., Li Y., Griffis C.L. & Johnson M.G. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and bioelectronics* **19**, 1139-1147 (2004).
131. Wu J., Ben Y. & Chang H.-C. Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping. *Microfluid Nanofluid* **1** , 161-167 (2005).
132. Cristiani P., Perboni G., Hilbert L., Mollica A. & Gubner R. Experiences on MIC monitoring by electrochemical techniques. 17-3-2002. Porto. Proceedings of the International Specialized Conference on Biofilm Monitoring.
133. Leboulanger C. *et al.* Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology* **30**, 83-89 (2002).
134. Mendes J.G., Melo L.F., Pereira A. & Mendes A. Method and device for the measurement and identification of biofilms and other deposits using vibrations. (103344). 2005. Portugal, PCT/IB2006/052992 (European Patent).
135. Tamachkiarow L. & Flemming H.C. On-line monitoring of biofilm formation in a brewery water pipeline system with a fibre optical device. *Water Science and Technology* **47**, 19-24 (2003).
136. Flemming,H.C., Tamachkiarowa,A., Klahre,J. & Schmitt,J. Monitoring of fouling and biofouling in technical systems. *Wat. Sci. Tech.* **38**, 291-298 (1998).

137. Nauman D., Helm D. & Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**, 81-82 (1991).
138. Jackson M., Sowa M.G. & Mantsch H.H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. *Biophysical Chemistry* **68**, 109-125 (1997).
139. Bremer P.J. & Geesey G.G. An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling* **3**, 89-100 (1991).
140. Geesey, G.G. & Suci, P.A. Biofilms: recent advances in their study and control. Evans, L.V. (ed.), pp. 253-277 (Harwood academic publishers, 2000).
141. Serra D. *et al.* Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1759-1767 (2007).
142. Naumann D. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers R.A. (ed.), pp. 1-28 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
143. Diem M., Boydston-White S. & Chiriboga L. Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject. *Applied Spectroscopy* **53**, 148A-161A (1999).
144. Schmitt, J., Nivens, D., White, D.C. & Flemming, H.C. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances - An FTIR-ATR study. *Wat. Sci. Tech.* **32**, 149-155 (1995).
145. Nivens, D. *et al.* Monitoring microbial adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 199-213 (1993).
146. Suci P.A., Siedlecki K.J., Palmer JR R.J., White D.C. & Geesey G.G. Combined light microscopy and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4600-4603 (1997).
147. Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P. & Geesey, G.G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 2125-2133 (1994).
148. Suci P.A., Geesey G.G. & Tyler B.J. Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **46**, 193-208 (2001).

Table des illustrations du chapitre I

FIGURE I- 1 : SCHEMA D'UNE BACTERIE GRAM-NEGATIF. LES NUMEROS CORRESPONDENT RESPECTIVEMENT A : 1. CAPSULE, 2. RIBOSOMES, 3. VACUOLE A GAZ, 4. GLYCOGENE, 5. MUCOPEPTIDE, 6. PLASMIDE, 7. PILI, 8. MEMBRANE EXTERNE, 9. LIPIDES, 10. GRANULE BASAL, 11. FLAGELLE, 12. CHROMATOPHORE, 13. CARBOXY SOME, 14. MESOSOME, 15. MATERIEL NUCLEAIRE, 16. CARBONATE DE CALCIUM, 17. PILI SEXUEL, 18. SOUFRE, 19. POLYPHOSPHATE, 20. POLY- β -HYDROXYBUTYRATE, 21. MEMBRANE CYTOPLASMIQUE.....	13
FIGURE I- 2 : COUPE DE L'ENVELOPPE D'UNE BACTERIE GRAM-NEGATIF ²⁸	14
FIGURE I- 3 : COURBE DE CROISSANCE BACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE, DANS UN SYSTEME EN BATCH. LES SIX PHASES DE CROISSANCE SONT INDIQUEES PAR DES NUMEROS (VOIR TEXTE POUR LEUR CORRESPONDANCE).....	18
FIGURE I- 4 : ETAPES DE FORMATION ET D'EVOLUTION D'UN BIOFILM SELON COSTERTON ³¹	23
FIGURE I- 5 : MODELE MOSAÏQUE D'UN BIOFILM PROPOSE PAR KEEVIL ET AL. ⁴² (A GAUCHE) ET MODELE DE BIOFILM EN CHAMPIGNON / CANAUX D'APRES COSTERTON (DROITE) (HTTP://WVLC.UWATERLOO.CA/BIOLOGY447/BIOFILMS/BIOFILMSOVERVIEW.HTM)	24
SCHEMA I- 1 : PARCOURS DE L'EAU DEPUIS LA SOURCE JUSQU'AU ROBINET DU CONSOMMATEUR ⁵⁷	27
TABLEAU I- 1 : COMPOSITION CHIMIQUE ET FONCTIONS DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS D'UNE CELLULE BACTERIENNE GRAM-NEGATIF. ABREVIATIONS : \emptyset = DIAMETRE, L = LONGUEUR	16
TABLEAU I- 3 : EXEMPLES DE LOCALISATION DES BIOFILMS ET DE LEURS EFFETS.	22

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Sommaire du chapitre II

II – I. Matériel	57
II – I.1. Souche utilisée : <i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13.....	57
II – I.2. Milieux nutritifs.....	57
II – I.2.1. Milieu de conservation.....	57
II – I.2.2. Milieux de culture.....	58
II – I.3. Eaux.....	58
II – I.4. Fluorochrome de marquage : le SYBR GREEN II.....	59
II – I.5. Verrerie utilisée lors des analyses de carbone.....	59
II – II. Méthodes de préparation des échantillons	59
II – II.1. Analyses de la quantité de carbone organique dissous total.....	59
II – II.1.1. Principe de la mesure.....	59
II – II.1.2. Préparation de la gamme étalon.....	60
II – II.1.3. Déroulement des mesures.....	60
II – II.2. Préparation des échantillons bactériens.....	61
II – II.2.1. Conditions de culture de <i>P. fluorescens</i> CIP 69.13 et établissement des courbes de croissance.....	61
II – II.2.2. Préparation des culots bactériens.....	61
II – II.2.3. Préparation des suspensions bactériennes pour les expériences IR-ATR.....	61
II – II.2.4. Lyophilisation des échantillons bactériens.....	62
II – II.2.5. Préparation des pastilles pour les analyses IR en Transmission.....	62
II – II.3. Protocoles expérimentaux pour le comptage des UFC.....	62
II – II.3.1. Cas des suspensions bactériennes.....	62
II – II.3.2. Cas des biofilms.....	64
II – II.4. Marquage des biofilms.....	64
II – III. Méthodes spectroscopiques	65
II – III.1. La spectroscopie Infrarouge.....	65
II – III.1.1. Principe.....	66
II – III.1.2. Exemple de vibrations rencontrées dans les protéines.....	66
II – III.2. Spectroscopie IR en mode Transmission.....	67
II – III.3. Spectroscopie IR en mode ATR.....	68
II – III.3.1. Principe.....	68
II – III.3.2. Caractéristiques de l'onde évanescente.....	68
II – III.3.3. Profondeur de pénétration effective <i>De</i>	71

II – III.3.4. Les accessoires et cristaux ATR.....	72
II – III.3.5. Enregistrement des spectres.....	76
II – III.3.6. Traitement des spectres.....	77
II – III.4. Spectrométrie Raman.....	77
II – III.4.1. Principe.....	77
II – III.4.2. Spectromètre Raman.....	79
II – III.4.3. Acquisition et traitement des spectres.....	79
Références bibliographiques du chapitre II.....	81
Table des illustrations du chapitre II.....	83

II - I. Matériel

II - I.1. Souche utilisée : *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13

P. fluorescens CIP 69.13 provient de l'Institut Pasteur (Paris). Elle a été choisie comme souche de référence pour former nos biofilms. Des observations réalisées au microscope (Figure II- 1) ont montré qu'en fin de phase exponentielle de croissance, après centrifugation (10 000 g, 10 min), les cellules de *P. fluorescens* ont un diamètre d'environ 0,4 μm et une longueur d'environ 2,5 μm .

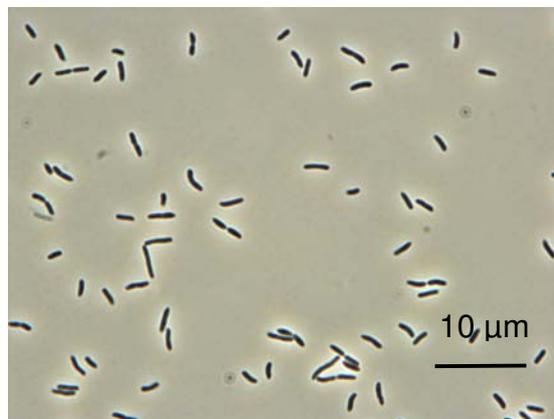


Figure II- 1 : Observation de *P. fluorescens* au microscope optique, à l'objectif x100. Les cellules ont été collectées en fin de phase exponentielle, puis centrifugées à 10 000 g pendant 10 min.

Sur une gélose nutritive, les colonies sont petites, rondes, plates et incolores.

II - I.2. Milieux nutritifs

II - I.2.1. Milieu de conservation

P. fluorescens CIP 69.13 est conservée à -80°C grâce au système Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, United Kingdom). Il s'agit d'un tube stérile contenant des billes poreuses immergées dans une solution cryoconservatrice et capables de stocker la souche bactérienne souhaitée.

II - I.2.2.Milieux de culture

Toutes les cultures de *P. fluorescens* ont été réalisées dans le milieu Luria-Bertani (LB) selon Miller (Difco, USA) dont la composition (en g/L) est décrite ci-dessous :

- Tryptone	10
- Extrait de levure	5
- NaCl	10

Les bouillons à 25 g/L sont préparés dans de l'eau désionisée (Millipore Corp., Milli-Q). Ceux à 0,5 g/L sont préparés dans de l'eau apyrogène stérile (Aqua B. Braun, Germany). Les solutions sont ensuite agitées puis autoclavées à 120°C pendant 20 minutes. Le pH des solutions obtenues est voisin de $6,9 \pm 0,1$ unités.

Le milieu solide R2A (Merck, Germany) a été utilisé pour le dénombrement des UFC.

II - I.3.Eaux

Mise à part l'eau MilliQ utilisée pour la préparation des bouillons de culture, deux autres types d'eau ont servi lors des expériences : l'eau apyrogène stérile et l'eau du réseau.

L'eau apyrogène stérile est utilisée dans la fabrication des solutions standard pour irrigation dans le domaine médical.

Elle est obtenue par prélèvement d'eau du réseau, puis subit deux purifications : la première consiste en une biosmose sous pression et la seconde en cinq ou six distillations. L'eau obtenue est très peu conductrice, au voisinage de $0,6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Son pH est ajusté entre 5 et 7 unité par de la soude. Elle contient au maximum 0,5 mg C/L.

Les échantillons d'eau du réseau ont été prélevés au LCPME sur le site de Villers-lès-Nancy. Ils sont recueillis dans de la verrerie préalablement nettoyée au mélange sulfochromique (Acros, réf. 29551-0010). Les prélèvements sont laissés à découvert pendant 24 heures afin de les déchlorer.

Dans le but de faire varier la concentration en carbone organique dissous (COD) dans une gamme de concentrations variant de 1,5 à 12 mg/L, du bouillon LB stérile a été ajouté aux échantillons d'eau prélevés.

II - I.4. Fluorochrome de marquage : le SYBR GREEN II

Le SYBR GREEN II[®] (Molecular Probes, USA) est un fluorochrome intercalant des acides nucléiques (ARN et ADN). Les seules données disponibles sont les suivantes :

$\lambda_{\text{ex maximum}} = 254 \text{ nm}$ et 497 nm (longueur d'onde d'excitation)

$\lambda_{\text{em maximum}} = 520 \text{ nm}$ (longueur d'onde d'émission)

Le SYBR GREEN II[®] possède une forte affinité pour les acides ribonucléiques, son rendement quantique (0,54) est nettement supérieur à celui du bromure d'éthidium (0,07). Par ailleurs, sa fluorescence intrinsèque est faible ce qui entraîne une faible fluorescence parasite s'il reste des molécules de colorant libres dans l'échantillon.

II - I.5. Verrerie utilisée lors des analyses de carbone

Deux types de vaisselle sont à considérer : les tubes et les flacons résistant à la chaleur et la vaisselle jaugée. Les traces de carbone sont éliminées, selon le cas, soit par chauffage au four, 4 h à 550°C, soit avec un mélange sulfochromique par trempage puis, rincé abondamment à l'eau apyrogène stérile

II - II. Méthodes de préparation des échantillons

II - II.1. Analyses de la quantité de carbone organique dissous total

Les mesures de CODT sont réalisées à l'aide d'un analyseur de carbone total TOC 5000A (Shimadzu, Japon) selon la méthode standard 5310B¹.

II - II.1.1. Principe de la mesure

L'échantillon à analyser subit, tout d'abord, une oxydation dans le tube à combustion de l'analyseur de carbone. Le CO₂ produit est ensuite acheminé, à l'aide d'un gaz vecteur, jusqu'à la cellule de détection à infrarouge. La quantité de CO₂ présente dans l'échantillon y est mesurée.

II - II.1.2.Préparation de la gamme étalon

Avant toute mesure de COD, l'appareil est calibré en préparant une gamme étalon d'hydrogénophthalate de potassium (Acros, réf. 177121000)

Une solution mère d'hydrogénophthalate de potassium à 200 mg C/L est préparée dans de l'eau MilliQ à partir d'une solution à 2 g C/L. Une gamme étalon (0, 1, 2 et 4 mg C/L) est préparée à partir de la solution à 200 mg C/L dans les fioles jaugées de 100 mL avec de l'eau MilliQ.

II - II.1.3.Déroulement des mesures

50 mL de chaque échantillon à analyser sont prélevés et dilués au $1/10^e$ dans de l'eau apyrogène stérile si la teneur en carbone de l'échantillon dépasse 5 mg C/L, c'est-à-dire la limite de détection du catalyseur. Ils sont ensuite filtrés sur membrane PVDF (filtre PVDF, Roth, ref. P812.1) de 0,45 μ m de porosité. Ces échantillons sont ensuite acidifiés avec 50 μ L d'HCl 2M afin d'éliminer le carbone inorganique.

Les tubes servant à établir la gamme étalon sont placés sur le passeur d'échantillons.

L'analyse de carbone démarre par un rinçage du système avec de l'eau MilliQ puis, chaque échantillon (y compris les étalons) est analysé trois fois.

L'analyse se déroule en deux étapes :

- la première consiste à ajouter 50 μ L d'acide chlorhydrique 2M à l'échantillon de façon à obtenir un pH de l'échantillon proche de 2. Le carbone inorganique contenu dans l'échantillon est transformé en CO₂ puis éliminé en faisant buller de l'oxygène environ 10 minutes.

- L'échantillon ainsi dégazé est injecté, dans la seconde étape, dans le tube à combustion contenant le catalyseur à haute sensibilité (analyse des teneurs en carbone comprises entre 1 μ g C/L et 5 mg C/L) chauffé à 680°C. De l'oxygène ultra pur (gaz vecteur) est introduit dans ce tube ce qui permet de véhiculer les gaz produits par l'oxydation de l'échantillon jusqu'à la cellule de détection à infrarouge. La quantité de CO₂ présente dans l'échantillon y est mesurée.

II - II.2.Préparation des échantillons bactériens

II - II.2.1.Conditions de culture de *P. fluorescens* CIP 69.13 et établissement des courbes de croissance

Les précultures de *P. fluorescens* ont été réalisées par inoculation d'une cryobille dans du milieu LB à 25 g/L pendant 24h.

Les cultures de *P. fluorescens* ont été effectuées en prélevant 40mL de préculture que l'on a introduit dans 400 mL de LB à 25 g/L de manière à obtenir une DO initiale de 0,05 à 620nm. La suspension est ensuite homogénéisée et mise à l'étuve à 27°C +/- 1°C, sous 290 tours/min.

Le suivi de la croissance et le comptage bactérien ont été réalisés en prélevant des aliquotes de 1 mL de suspension. Une mesure de densité optique à 620 nm (DO₆₂₀) est réalisée, toutes les 30 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre WPA spectrawave S 1000 Diode Array (Biochrom, Biolabo). Les lectures se font en semi-microcuvettes jetables avec comme solution de référence le milieu de culture LB à 25 g/L.

Un dénombrement des bactéries cultivables (UFC) est effectué, toutes les heures, par étalement d'aliquotes de 100µL, sur R2A agar, à la dilution appropriée.

II - II.2.2.Préparation des culots bactériens

Grâce à la courbe de croissance obtenue, les suspensions bactériennes sont prélevées à différents temps, correspondants à des phases de croissance différentes. Lors de chaque prélèvement, les suspensions sont centrifugées à 10 000 g pendant 10 min. Une partie du culot est prélevée à l'aide d'une pipette stérile pour nos études spectroscopiques.

II - II.2.3.Préparation des suspensions bactériennes pour les expériences IR-ATR

Toutes les suspensions bactériennes ont été réalisées à partir d'une pré-culture suivie d'une culture de *P. fluorescens* dans du milieu LB à 25 g/L. Les cellules sont prélevées en fin de phase exponentielle de croissance et centrifugées à 10 000 g, pendant 10 minutes, à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans une solution stérile à 0,5 g/L de milieu LB. La concentration bactérienne de la suspension obtenue est ajustée à une DO de 0,28, ce qui correspond à une concentration cellulaire d'environ 10⁸ UFC/mL.

II - II.2.4. Lyophilisation des échantillons bactériens

Le lyophilisateur du laboratoire est un appareil Benchtop 3.3, de marque VIRTIS. Le vide est assuré par une pompe primaire à palette de marque AEG (type AMEB 71 FV4 R3). Le volume de condensation en 24 heures est de un litre, et la capacité maximale de condensation est de 3,3 litres. Le corps refroidissant est à une température de fonctionnement de -95 à -100 °C. Le vide en fonctionnement est inférieur au milli Torr. La préparation des échantillons a nécessité beaucoup de précautions afin de minimiser les contaminations et le réarrangement des molécules. Après avoir été centrifugé et lavé une fois à l'eau MilliQ stérilisée, le culot bactérien est transféré dans un pilulier en verre préalablement refroidi à l'azote liquide. Puis, le tout est replongé dans l'azote liquide avant d'être conservé au congélateur à -80 °C pendant une nuit. Le lendemain, les échantillons sont disposés dans le lyophilisateur.

La lyophilisation dure au minimum 48 heures. Les échantillons sont ensuite conservés dans un dessiccateur avec du P_2O_5 , à l'abri de la lumière.

II - II.2.5. Préparation des pastilles pour les analyses IR en Transmission

Les pastilles ont été préparées avec du bromure de potassium (KBr) (Spectronorm, Prolabo) préalablement séché pendant au moins une nuit à 130 °C, dans une étuve. 2 mg d'échantillon bactérien lyophilisé (1mg pour *P. fluorescens* après 8 jours de croissance) et 198 mg de KBr ont été mélangés et broyés dans un mortier en agathe. La poudre est alors pastillée avec une pression de 300 kg/cm^2 , appliquée pendant 5 minutes. La pastille qui en résulte, d'aspect translucide, correspond à une dispersion de l'échantillon dans une matrice solide. Le spectre infrarouge est immédiatement enregistré.

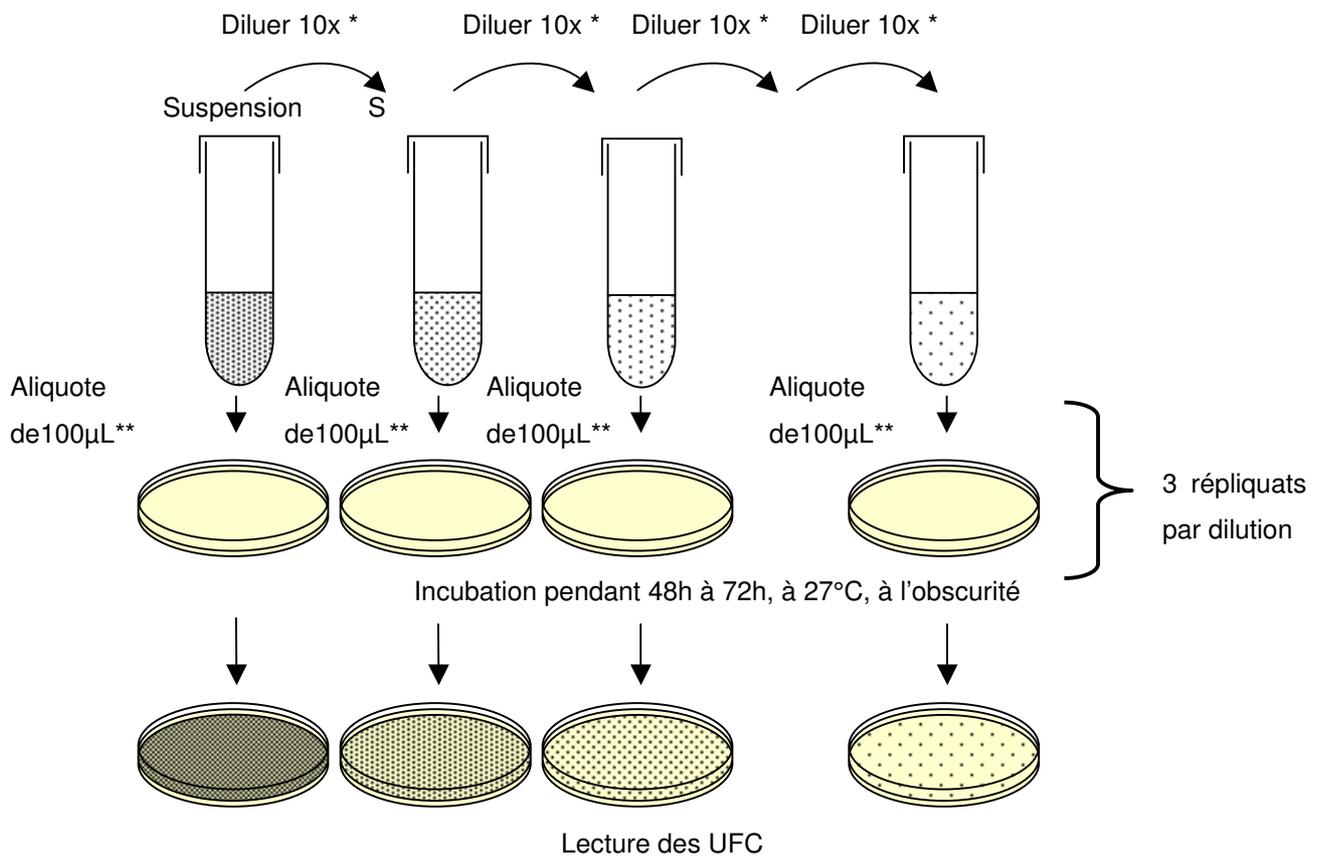
Remarque : tous les accessoires utilisés pendant l'étape de préparation des pastilles sont placés dans une étuve à 50 °C, avant usage, pour les maintenir aussi secs que possible.

II - II.3. Protocoles expérimentaux pour le comptage des UFC

II - II.3.1. Cas des suspensions bactériennes

Soit S la suspension bactérienne à analyser.

Les échantillons sont dilués en cascade de 10^0 à 10^{-6} dans de l'eau apyrogène stérile (Figure II-2). 100 μ L d'échantillon homogénéisé est ensuite incorporé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose R2A



* Dilution dans l'eau apyrogène stérile puis vortexation

** Étalement au râteau de chaque aliquote

Figure II- 2 : Protocole expérimental pour le comptage des UFC sur gélose R2A.

Le comptage se fait après 48 h d'incubation à l'obscurité.

On choisit le facteur de dilution qui correspond à des colonies isolées sur la gélose pour obtenir un nombre total de colonies compris entre 40 et 200.

La concentration de la suspension S est donnée par :

$$[S] = n * 10_a^{dil} * \frac{1000}{100}$$

Avec :

[S] la concentration de la suspension S exprimée en UFC/mL

n le nombre moyen de colonies

10_a^{dil} le facteur de dilution approprié

Le nombre moyen de colonies, pour la dilution considérée, est calculé en faisant la moyenne des colonies comptées sur les trois répliquats.

Les mêmes protocoles ont également été utilisés pour suivre l'évolution des cultures bactériennes lors de l'établissement des courbes de croissance.

II - II.3.2.Cas des biofilms

A la fin d'une expérience d'adhésion bactérienne suivie par IR-ATR, le cristal est extrait de la cellule à circulation, sous des conditions stériles, puis est rincé trois fois dans de l'eau apyrogène stérile afin d'enlever les bactéries non adhérees. Une partie du biofilm (en général 1 cm sur 0,6 cm) est raclée à l'aide d'un écouvillon stérile. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans de l'eau apyrogène stérile et le protocole de comptage des UFC détaillé sur la Figure II- 2 est appliqué.

II - II.4.Marquage des biofilms

Le protocole de marquage d'un biofilm de *P. fluorescens* est résumé Figure II- 3. Les cellules bactériennes ne sont pas décrochées de la surface du cristal afin de conserver la structure du biofilm. Le marquage se fait directement en déposant une solution diluée de SYBR GREEN II sur le biofilm.

Chaque cristal est observé à l'objectif *100 d'un microscope à épifluorescence Olympus BX51.

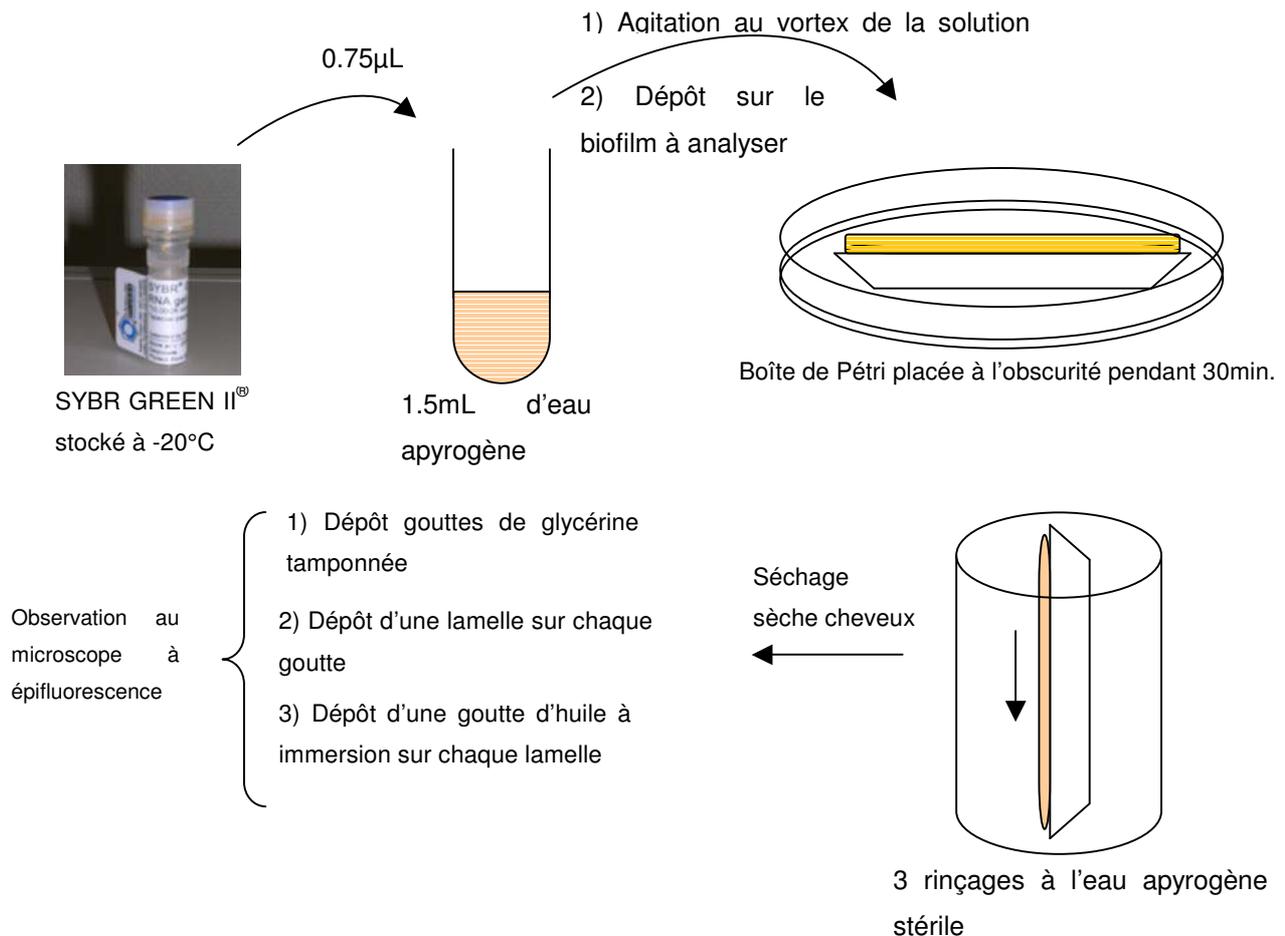


Figure II- 3 : Principales étapes lors du marquage par le SYBR GREEN II d'un biofilm de *P. fluorescens* adhérentes sur le cristal ATR

II - III. Méthodes spectroscopiques

II - III.1. La spectroscopie Infrarouge

Le domaine infrarouge est compris entre 10 cm^{-1} et 12500 cm^{-1} et est divisé en trois domaines :

- le lointain infrarouge entre 10 et 400 cm^{-1}
- le moyen infrarouge entre 400 et 4000 cm^{-1}
- le proche infrarouge entre 4000 et 12500 cm^{-1}

Les spectres présentés dans cette étude ont été collectés dans la région du moyen infrarouge. Cette région correspondant d'une part aux empreintes spectrales des groupes fonctionnels constituant les bactéries et d'autre part, au domaine de transparence des cristaux ATR utilisés (germanium et diamant).

II - III.1.1.Principe

Dans la gamme des énergies correspondant au domaine infrarouge, ce sont les énergies de vibration des atomes et des mouvements de la couche électronique qui sont perturbées. Le fait que l'état énergétique de la molécule soit décrit par des niveaux discrets d'énergie, implique que l'interaction entre l'onde incidente et la molécule ne se fait que pour des valeurs précises d'énergie. La spectroscopie d'absorption IR donne des informations sur les vibrations moléculaires qui sont caractéristiques de l'environnement local des liaisons chimiques et de leur nature.

En IR, une molécule est capable d'interagir avec le champ électromagnétique et d'absorber un photon de fréquence ν , si elle possède au moins transitoirement, un dipôle oscillant à cette fréquence.

Si on apporte de l'énergie au système par l'intermédiaire d'un rayon lumineux, il l'absorbe à condition que l'énergie du rayonnement soit égale au pas énergétique séparant le niveau fondamental et le premier niveau excité. Il faut en d'autres termes satisfaire à la relation :

$$\Delta E = h\nu$$

avec h la constante de Planck égale à $6,6256 \cdot 10^{-34}$ J.s et ν est la fréquence de l'onde électromagnétique.

II - III.1.2.Exemple de vibrations rencontrées dans les protéines

La liaison peptidique –CONH- caractérise les protéines. Du fait du phénomène de résonance qui s'établit entre les atomes, la liaison est stabilisée et adopte une configuration plane, comme on peut le voir sur la Figure II- 4.

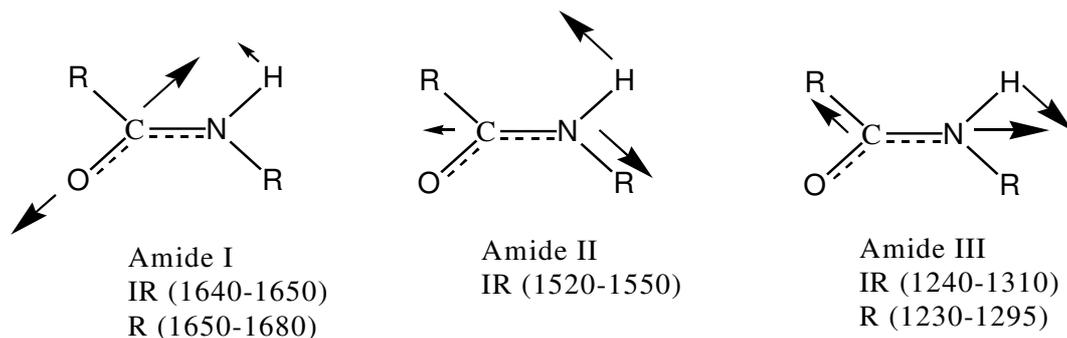


Figure II- 4 : Modes de vibrations du lien peptidique. Les flèches indiquent les mouvements des atomes entrant en jeu dans le mode de vibration considéré. Les activités infrarouge (IR) et Raman (R) ainsi que les nombres d'ondes correspondants sont indiqués sous chaque mode de vibration.

Chaque vibration mettant en jeu la liaison peptidique porte un nom spécifique. Lorsque la vibration d'élongation C=O est prépondérante, on parle de bande amide I. Les bandes amides II et III se caractérisent, quant à elles, par la vibration de déformation N-H couplée à l'élongation C-N avec des proportions différentes pour chacune d'elles.

II - III.2.Spectroscopie IR en mode Transmission

Lorsqu'un rayonnement incident d'intensité $I_0(\lambda)$, monochromatique pénètre dans un échantillon absorbant dans l'IR et contenant i molécules différentes, de concentration c , de coefficient d'extinction $\epsilon(\lambda)$, d'épaisseur l , (Figure II- 5) le rayonnement transmis obéit à la loi de Beer-Lambert (éq.3).

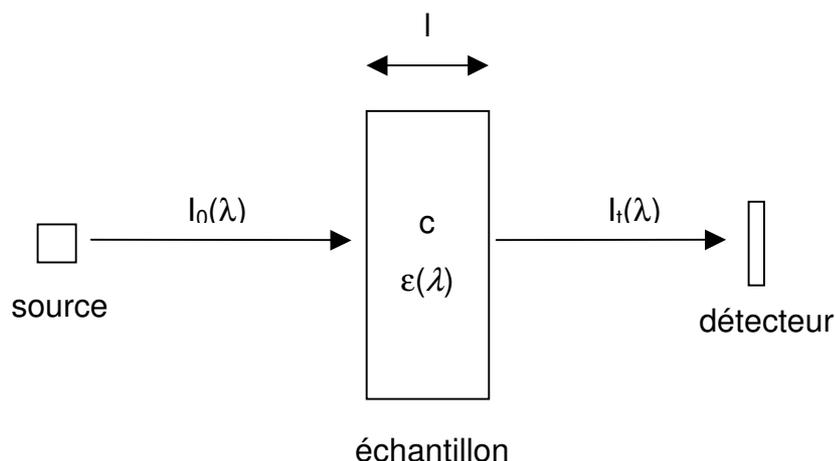


Figure II- 5 : Illustration du principe de la loi de Beer-Lambert

On définit alors la transmittance $T(\lambda) = \frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)}$ souvent exprimée en %. On emploie également l'absorbance (ou densité optique) définie par :

$$A(\lambda) = -\log \frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)} = -\log T(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) c_i l \quad (\text{éq.3})$$

L'eau ayant un coefficient d'absorption fort, l'obtention de spectres en solution aqueuse est difficile.

II - III.3.Spectroscopie IR en mode ATR

II - III.3.1.Principe

Le principe de l'ATR consiste à faire subir au faisceau IR une ou plusieurs réflexions à l'interface entre un matériau transparent dans l'IR, d'indice de réfraction élevé, et l'échantillon, en contact intime avec le cristal.

Pour des angles d'incidence supérieurs à un angle critique, θ_c , dont le sinus est égal au rapport de l'indice de réfraction (n_2) de l'échantillon (milieu rare) sur l'indice de réfraction (n_1) du cristal (milieu dense) (éq.5), le faisceau subit une réflexion totale à l'intérieur du milieu dense, s'il provient de celui-ci :

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad \text{éq.5}$$

Le faisceau guidé est légèrement perturbé par l'existence d'ondes progressives transversales appelées 'ondes évanescentes'.

II - III.3.2.Caractéristiques de l'onde évanescente

A chaque réflexion, une onde évanescente (éq.6) est générée au niveau du milieu rare au contact du milieu dense. Elle pénètre faiblement dans l'échantillon à une profondeur qui dépend de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon et de l'angle d'incidence.

Son énergie peut s'écrire de la façon suivante (éq.6) :

$$E = E_0 \cdot \exp(-z/Dp) \quad \text{éq.6}$$

avec : E_0 l'amplitude maximale du champ propagatif

E l'amplitude du champ propagatif à la distance z

D_p la profondeur de pénétration de l'onde évanescente

Cette onde pénètre de quelques micromètres dans le milieu rare qui est en contact avec le milieu dense dans lequel se produit la réflexion interne. La Figure II- 6, tiré d'une publication de Goormaghtigh et al.² illustre la décroissance exponentielle de l'amplitude de l'onde évanescente en fonction de sa distance à l'interface.

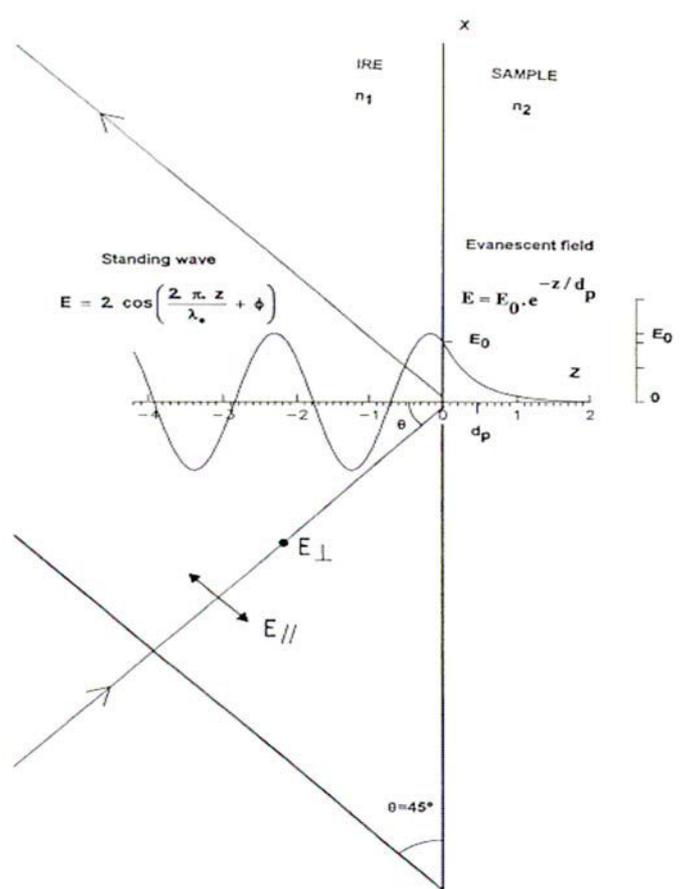


Figure II- 6 : Comportement du faisceau IR à l'interface cristal / milieu extérieur. Les détails du champ électrique de la radiation électromagnétique en un point de réflexion, à l'interface cristal / milieu extérieur sont représentés. Une onde progressive, appelée onde évanescente, est créée et permet de sonder l'échantillon en contact avec le cristal.

La profondeur de pénétration, D_p , de l'onde évanescente, dans l'échantillon déposé à la surface du cristal est définie comme la distance pour laquelle le champ électrique, E , décroît vers la valeur $1/e$.

Elle est donnée par la relation (éq.7) :

$$D_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{(\sin^2 \theta - (\frac{n_2}{n_1})^2)}} \quad \text{éq.7}$$

Elle est fonction de :

- la longueur d'onde considérée (λ)
- l'angle d'incidence du faisceau IR au niveau du cristal (θ)
- l'indice de réfraction du cristal (n_1) et de l'échantillon (n_2)

En appliquant cette relation à quelques longueurs d'onde de choix, telles que $\lambda = 3000\text{cm}^{-1}$, 1550cm^{-1} et 1100cm^{-1} pour des cristaux ATR de germanium, d'indice de réfraction 4,0, et de diamant, d'indice de réfraction 2,4, avec des angles d'incidence de 45° , et en considérant un indice de réfraction moyen de 1,5 pour le biofilm^{3,4}, on obtient les valeurs du Tableau II- 1.

Cristal./nombre d'onde	3000 cm^{-1}	1550 cm^{-1}	1100 cm^{-1}
Ge	0,22	0,42	0,59
diamant	0,67	1,29	1,82

Tableau II- 1 : Evolution de D_p (μm) de l'onde évanescente à la surface de deux cristaux ATR, en fonction du nombre d'onde.

Dès que l'onde évanescente pénètre dans l'échantillon, elle s'atténue d'autant plus rapidement que l'on est à haut nombre d'onde. On notera également une forte influence de l'indice de réfraction du cristal : plus il est élevé et moins la profondeur de pénétration est importante.

Comme la profondeur de pénétration est faible, et que l'amplitude du champ propagatif s'atténue exponentiellement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface du cristal, il est nécessaire que l'échantillon soit en contact intime avec le cristal lors de la mesure.

II - III.3.3. Profondeur de pénétration effective D_e

Pour pouvoir comparer des spectres enregistrés en mode ATR à des spectres enregistrés en mode transmission, il est nécessaire de calculer le volume de l'onde évanescente, encore appelé pénétration effective, D_e , du faisceau IR.

D_e est définie comme l'épaisseur de la couche nécessaire, dans des mesures en transmission, pour obtenir la même extinction avec une simple réflexion à la frontière d'un milieu rare optiquement semi-infini.

Pour une polarisation perpendiculaire et parallèle du faisceau IR, les composantes de D_e s'expriment selon les deux équations suivantes :

$$D_{e\perp} = \frac{n_1^2 n_2 \cos \theta}{(n_1^2 - n_2^2)} \times \frac{\lambda}{\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad \text{éq.8}$$

$$D_{e\parallel} = \frac{n_1^2 n_2 \cos \theta}{(n_1^2 - n_2^2)} \times \frac{2n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}{(n_1^2 - n_2^2) \sin^2 \theta - n_2^2} \times \frac{\lambda}{\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad \text{éq.9}$$

Dans le cas d'un faisceau IR non polarisé, D_e correspond à la somme des pénétrations perpendiculaires et parallèles :

$$D_e = \frac{D_{e\perp} + D_{e\parallel}}{2} \quad \text{éq.10}$$

Voici, à titre d'illustration, quelques valeurs d'épaisseur effectives obtenues dans le cas de cristaux ATR de germanium présentant un indice de réfraction de 4,0, un angle d'incidence de 45°, en contact avec un biofilm d'indice de réfraction moyen de 1,5^{3,4} (Tableau II- 2).

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	$D_{e\perp}$ (x 10 ⁻⁶ m)	$D_{e\parallel}$ (x 10 ⁻⁶ m)	D_e (x 10 ⁻⁶ m)
1085	1,39	2,79	2,09
1234	1,23	2,45	1,84
1400	1,08	2,16	1,62
1548	0,97	1,95	1,47
1650	0,92	1,83	1,37
3000	0,50	1,01	0,76

Tableau II- 2 : Evolution de la profondeur de pénétration effective, D_e , de l'onde évanescente à la surface d'un cristal ATR de germanium, en fonction du nombre d'onde (μm).

II - III.3.4. Les accessoires et cristaux ATR

Les manipulations en batch telles que la prise de spectres des culots bactériens aux différentes phases de croissance ont été réalisées en utilisant un accessoire ATR diamant. Les manipulations de suivi de biofilms ont été réalisées à l'aide d'un accessoire ATR muni d'une cellule à circulation contenant un cristal de germanium. Les deux cristaux utilisés sont transparents dans l'IR, à haut indice de réfraction et non cytotoxique ce qui les rend adaptés à nos mesures.

☞ L'accessoire ATR diamant

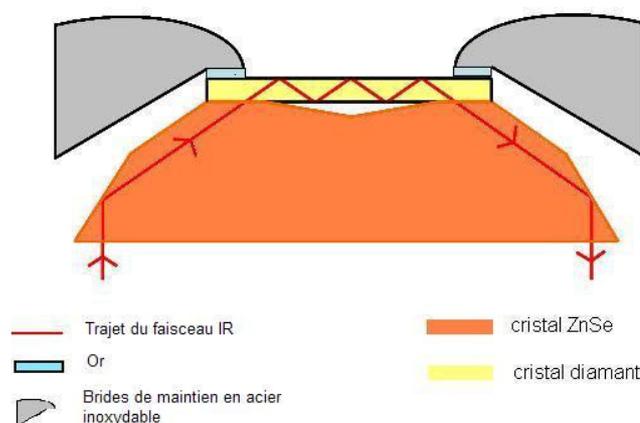


Figure II- 7 : Schéma du principe de l'accessoire ATR diamant DuraSamplIR avec trois réflexions (Thermo Optek corporation, Nicolet instrument, Trappes, France)

Comme nous le montre la Figure II- 7, l'accessoire ATR diamant est en réalité constitué de deux cristaux joints ayant même indice de réfraction (l'un en ZnSe et l'autre en diamant). Le faisceau IR incident pénètre successivement à l'intérieur du ZnSe, puis à l'intérieur du diamant avec une incidence de 45° où il subira, dans notre cas, neuf réflexions (soit une profondeur de pénétration cumulée à l'intérieur de l'échantillon d'environ $18 \mu\text{m}$). Le faisceau réfléchi repasse ensuite dans le ZnSe pour arriver au détecteur du spectromètre. Les principales propriétés des cristaux diamant et ZnSe ont été rappelées dans le Tableau II- 3.

Cristaux	Diamant / ZnSe	Germanium
Domaine de transmission IR	20 000 – 500 cm^{-1}	5 000 – 600 cm^{-1}
Indice de réfraction	2,4	4,0
Dimensions (mm)	Diamètre : 4	77 x 10x 6
Echelle de pH	1 – 14	1 - 14
Solubilité	Insoluble dans l'eau Résistants aux solvants organiques, aux acides dilués et bases	Insoluble dans l'eau Soluble dans l'acide sulfurique chaud Soluble dans l'eau régale
Dureté (kg/mm^2)	5 700	550, très fragile

Tableau II- 3 : Principales propriétés des cristaux ATR de diamant et ZnSe (2^e colonne) et des cristaux ATR de germanium (3^e colonne) utilisés.

☞ L'accessoire ATR à circulation

La Figure II- 8 présente le schéma de la cellule ATR à circulation ainsi que le parcours du faisceau IR à l'intérieur d'un cristal ATR.

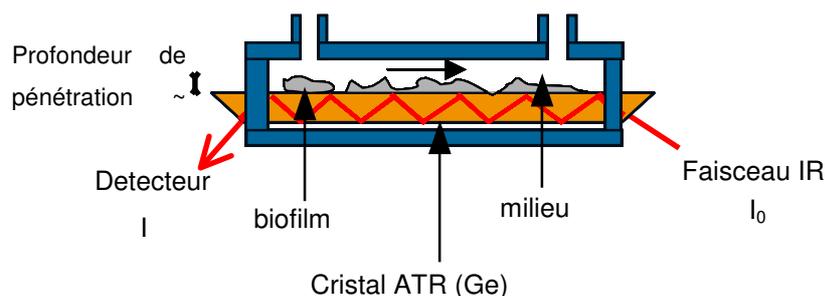


Figure II- 8 : Schéma de la cellule à circulation ATR. La flèche à l'intérieur de la cellule représente le sens de circulation des différentes solutions / suspensions auxquelles est exposé le cristal.

Le cristal de germanium est trapézoïdale, d'angle d'incidence 45° et permettant six réflexions du faisceau IR.

Des cristaux de germanium ont été choisis pour l'étude de l'adhésion bactérienne par IR du fait de leur insolubilité dans l'eau, solvant présent dans tous les échantillons biologiques, de leur transparence dans l'IR et enfin de leur non cytotoxicité qui selon

Durham *et al.*⁵ est un des paramètres essentiel pour obtenir une bonne adhésion bactérienne.

Les caractéristiques propres des cristaux de germanium utilisés sont indiquées dans le Tableau II- 3.

☞ Circuit expérimental

Une photo du montage expérimental utilisé lors des expériences de formation et de suivi du biofilm est présentée Figure II- 9.



Figure II- 9 : Photographie du montage expérimental utilisé lors des expériences de formation et suivi de biofilms.

Le circuit ouvert se compose (de gauche à droite) : d'un flacon d'inoculation, de la cellule à circulation, disposée à l'intérieur du spectromètre Bruker, d'une pompe péristaltique assurant un débit constant égal à 0,7 mL/min, et d'une poubelle. Les différents éléments sont reliés par des tuyaux en silicone autoclavables. Le dispositif se trouve dans une pièce, borgne, climatisée à 21°C.

☞ Désinfection du circuit utilisé lors des expériences IR en mode ATR

Avant chaque manipulation, la cellule à circulation est nettoyée avec une solution à 2% de Triton X-100, rincée à l'eau bouillante puis à l'eau apyrogène stérile. Le cristal est ensuite monté dans la cellule puis, un spectre est enregistré afin de contrôler la propreté du cristal. La cellule est ensuite raccordée au circuit puis, afin de le désinfecter, de l'éthanol à 70% est mis en circulation pendant 4-5 h. Puis, de l'eau apyrogène stérile circule en débit lent (12 h), puis en débit rapide (1-2 h) afin d'enlever les traces d'éthanol résiduelles. Une vérification de toutes ces étapes est faite en enregistrant des spectres.

☞ Formation du film conditionnant de LB et adhésion bactérienne

Immédiatement après l'étape de désinfection du circuit, décrite dans le paragraphe précédent, la cellule à circulation est successivement et sous conditions stériles inoculée avec :

- une solution de milieu stérile LB à 0,5 g/L durant 24h afin d'établir à la surface du cristal un film conditionnant et fournir un spectre de référence pour les spectres bactériens
- une suspension bactérienne de concentration 10^8 UFC/mL inoculée dans du milieu stérile LB à 0,5 g/L, pendant 3 h dans le but d'initier l'adhésion bactérienne à la surface du cristal et ainsi la formation du biofilm

Remarque : les tuyaux en silicone situés à l'entrée de la cellule ATR sont remplacés par des nouveaux, stériles, à la fin de cette étape.

☞ Influence de la quantité de COD sur l'évolution du biofilm

Les biofilms de référence, formés par passage de la suspension bactérienne, durant 3h, sont exposés à divers milieux mis en circulation avec un débit de 0,7 mL/min :

- au milieu stérile LB à 0,5 g/L (correspondant à 165 mgCOD/L) afin de promouvoir leur développement
- et/ou une série d'échantillons d'eau du réseau déchlorés et stériles contenant du COD dont la concentration varie entre 2,3 et 11,8 mg/L.

Il convient de noter qu'entre chaque solution, une bulle d'air est formée afin que les deux échantillons ne se mélangent pas.

II - III.3.5. Enregistrement des spectres

Deux spectromètres différents ont été utilisés au cours de nos manipulations.

☞ Spectres des culots bactériens

Les spectres des culots bactériens aux différentes phases de croissance ont été enregistrés entre 4000 et 800 cm^{-1} , à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer system 2000 à Transformée de Fourier. L'interféromètre de Michelson est équipé d'une séparatrice en KBr, pour la zone du MIR, et le détecteur utilisé est un détecteur pyroélectrique DTGS (Sulfate de Triglycine Deutériée). Pour chaque spectre, 20 accumulations ont été réalisées (ce qui correspond à 4 min d'accumulation) avec une résolution de 4 cm^{-1} . La zone analysée correspond à environ toute la surface du cristal, soit 50 mm^2 .

Le spectromètre est contrôlé par le logiciel Spectrum 5.0.1.

☞ Spectres des biofilms

Les spectres MIR ont été enregistrés, entre 4000 et 800 cm^{-1} , à l'aide d'un spectromètre BRUKER Vector 22 à Transformée de Fourier équipé d'une source Globar IR, d'une séparatrice de faisceau en KBr, ainsi que d'un détecteur thermique en DTGS (Bruker, Germany).

Pour chaque spectre 100 accumulations (correspondant à 1 min d'enregistrement) avec une résolution de 4 cm^{-1} ont été programmées (Apodisation Blackman-Harris 3-Term). La taille de la zone analysée est d'environ 6 * 48 mm^2 .

Dans le cadre du suivi de la cinétique de formation du biofilm, un enregistrement automatique des spectres est ainsi utilisé et est lancé comme suit :

- toutes les 2 heures pendant 4 heures lors du passage de l'éthanol
- toutes les heures pendant 12 heures lors du passage de l'eau apyrogène stérile
- toutes les heures pendant 24 heures lors du passage de la solution de LB stérile (le cas échéant)
- toutes les 10 minutes pendant les 3 premières heures, puis toutes les 15 minutes lors du passage de la suspension bactérienne
- toutes les 15 minutes lors du passage de la solution stérile de LB
- ou toutes les 10 minutes lors du passage de l'eau du réseau de distribution testée

A chaque étape, le spectre de référence enregistré et utilisé dans le calcul du spectre en absorbance correspond au dernier spectre simple faisceau de l'échantillon précédent. Par exemple, le dernier spectre simple faisceau échantillon de l'eau apyrogène stérile

correspondra au spectre simple faisceau référence dans le calcul du spectre en absorbance du spectre représentant les bactéries adhérees à la surface du cristal.

Le logiciel OPUS NT version 3.1 (Bruker) assure la commande du spectromètre et permet d'acquérir et de traiter les spectres.

II - III.3.6.Traitement des spectres

Les spectres obtenus ont été traités sous ORIGIN 6.0 (Microcal) de la façon suivante :

- la vapeur d'eau a été soustraite, grâce à un spectre enregistré au début de l'expérience,
- l'eau a été soustraite en se basant sur la bande à 2120 cm^{-1}
- la ligne de base a été corrigée en plusieurs points : 1760 , 1342 , 1280 et 1006 cm^{-1}
- l'intégration des bandes amide II et PS (polysaccharides + acides nucléiques), centrées respectivement à 1548 cm^{-1} et 1085 cm^{-1} , ont été intégrées entre 1483 cm^{-1} et 1593 cm^{-1} pour la première et entre 1006 cm^{-1} et 1141 cm^{-1} pour la seconde.

Remarque : tous les spectres présentés n'ont subi aucune correction ATR.

II - III.4.Spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman est une spectroscopie vibrationnelle. Du fait de règles de sélection différentes de l'IR, elle apparaît comme une technique complémentaire.

II - III.4.1.Principe

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique de fréquence ν interagit avec une molécule, la radiation excitatrice peut être transmise, absorbée, réfléchie ou diffusée. Dans le dernier cas, les photons peuvent être diffusés suite :

- à une collision élastique, on parle alors de **diffusion Rayleigh** : les photons diffusés conservent la même énergie que leur énergie initiale. Il n'y a pas de changement de longueur d'onde de la radiation incidente mais seulement un changement de direction. L'énergie électromagnétique est soit redistribuée spatialement selon une direction particulière ou dans toutes les directions.
- à une collision inélastique, il s'agit de **l'effet Raman** : un transfert d'énergie ΔE a lieu entre les photons d'énergie $h\nu$ et la molécule se trouvant dans un état d'énergie E_j . Cet effet est très faible : approximativement un photon sur un million est émis avec une fréquence légèrement différente de la fréquence d'onde incidente.

La Figure II- 10 illustre le principe de la diffusion Raman⁶.

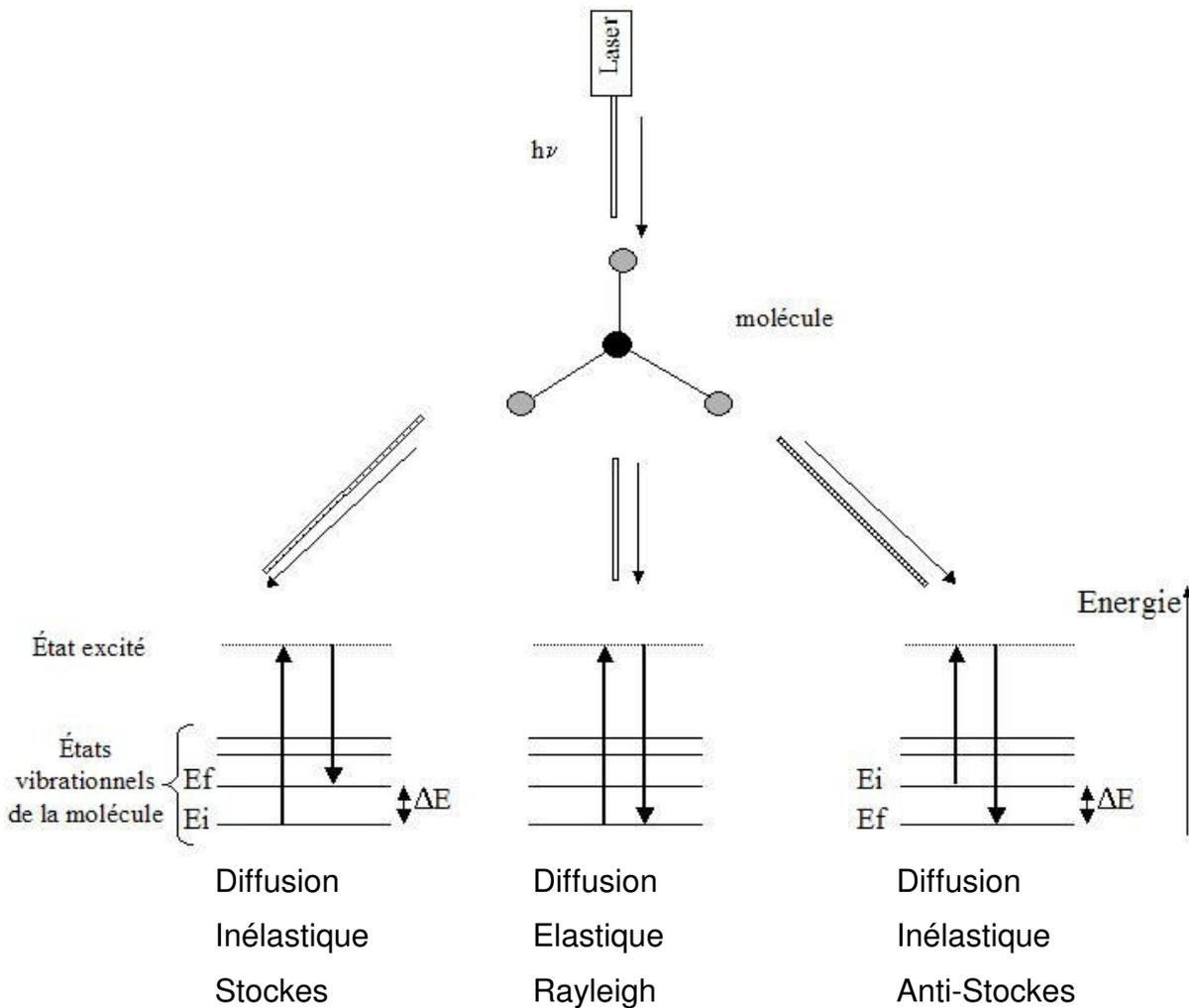


Figure II- 10 : Principe de la diffusion Raman

ΔE représente la variation d'énergie de la molécule

$\Delta E = h\nu = E_i - E_f$ avec E_i représentant l'énergie initiale de la molécule avant collision

avec le photon

E_f représentant l'énergie finale de la molécule après collision

avec le photon

Pour qu'une liaison soit active en Raman, il est nécessaire qu'elle possède une polarisabilité. Les liaisons dont la polarisabilité est forte, présentent des bandes de forte intensité et inversement. Pour établir un lien avec la spectroscopie IR, nous pouvons dire d'une manière simplifiée qu'une liaison polarisée sera davantage sensible en IR alors qu'à l'inverse, une liaison faiblement polarisée, donc plus fortement polarisable, sera plus

sensible en diffusion Raman. Les deux techniques IR et Raman sont ainsi très complémentaires.

La spectrométrie Raman présente de multiples avantages :

- l'utilisation d'un faisceau monochromatique, étroit, cohérent (source laser) permet une analyse très localisée d'un échantillon pouvant ainsi être en très faible quantité
- l'eau diffuse peu. Ceci se révèle être très utile pour l'analyse *in situ* d'échantillons biologiques et microbiologiques en solution aqueuse.

Toutefois, l'utilisation d'un laser trop puissant peut dégrader l'échantillon. De plus, il peut y avoir une fluorescence parasite qui peut masquer le spectre Raman de l'échantillon. Afin de remédier à ces problèmes, on peut avoir recours à une autre longueur d'onde du laser.

II - III.4.2.Spectromètre Raman

Les spectres de diffusion Raman ont été collectés grâce au spectromètre Raman T64000 (Jobin-Yvon, France). Un laser Argon Spectra Physics (Stabilité 2017) excite l'échantillon avec un faisceau de longueur d'onde excitatrice de 514,53 nm. Le faisceau incident est focalisé par l'objectif x100 d'un microscope confocal Olympus (modèle BX41) et arrive sur l'échantillon, provoquant ainsi la diffusion Raman de photons dans toutes les directions.

Seuls les photons rétrodiffusés sont collectés par l'objectif du microscope puis, focalisés sur la fente d'entrée du monochromateur. Finalement, le faisceau diffusé est dispersé par un détecteur CCD (Charge Coupled Device) refroidi à l'azote liquide.

II - III.4.3.Acquisition et traitement des spectres

Chaque échantillon (biofilm, culot bactérien) est analysé à l'aide d'objectifs plans (Olympus MPLAN x100 (ouverture numérique de 0,95) et x50 (ouverture numérique de 0,55)). La focalisation du faisceau laser sur la zone de l'échantillon à analyser est réalisée en utilisant un microscope couplé à une caméra et une platine de microscope réglable. Le faisceau laser excitateur est focalisé sur une zone d'échantillon d'un diamètre de l'ordre de 0,24 μm (résolution spatiale latérale) et d'une profondeur de l'ordre de 0,78 μm (résolution spatiale axiale).

La puissance laser incidente est typiquement ajustée entre 5 et 8 mW, au niveau de l'échantillon, afin de ne pas provoquer une surchauffe voire une destruction de ce dernier. Le spectre est acquis sur cinq zones centrées respectivement à 500 cm^{-1} ; 1100 cm^{-1} ;

1650 cm^{-1} ; 2900 cm^{-1} ; 3300 cm^{-1} ; le nombre d'accumulations variant de 1 à 3 et le temps d'accumulation pour une zone varie de 60 à 180 s. Les spectres sont acquis à l'aide du logiciel Spectramax avant d'être importés dans ORIGIN[®] (Microcal) où ils seront traités.

Références bibliographiques du chapitre II

1. APHA, AWWA & WEF (American Public Health Association - American Water Works Association - Water Environment Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C. (1998).
2. Goormaghtigh E., Raussens V. & Ruyschaert J.M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1422**, 105-185 (1999).
3. Reiter G. *et al.* Interaction of a bacterial endotoxin with different surfaces investigated by in situ Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Langmuir* **18**, 5761-5771 (2002).
4. Arakawa E., Tuminello P.S., Khare B.N. & Milham M.E. Optical properties of horseradish peroxidase from 0.13 to 2.5 μm . *Biospectroscopy* **3**, 73-80 (1997).
5. Durham D.R., Marshall L.C., Miller J.G. & Chmurny A.B. Characterisation of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3329-3335 (1994).
6. Long D.A. Raman spectroscopy. Mc Graw-Hill international book company, Great Britain (1977).

Table des illustrations du chapitre II

FIGURE II- 1 : OBSERVATION DE <i>P. FLUORESCENS</i> AU MICROSCOPE OPTIQUE, A L'OBJECTIF X100. LES CELLULES ONT ETE COLLECTEES EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE, PUIS CENTRIFUGEES A 10 000 G PENDANT 10 MIN.....	57
FIGURE II- 2 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR LE COMPTAGE DES UFC SUR GELOSE R2A.	63
FIGURE II- 3 : PRINCIPALES ETAPES LORS DU MARQUAGE PAR LE SYBR GREEN II D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> ADHEREES SUR LE CRISTAL ATR.....	65
FIGURE II- 4 : MODES DE VIBRATIONS DU LIEN PEPTIDIQUE. LES FLECHES INDIQUENT LES MOUVEMENTS DES ATOMES ENTRANT EN JEU DANS LE MODE DE VIBRATION CONSIDERE. LES ACTIVITES INFRAROUGE (IR) ET RAMAN (R) AINSI QUE LES NOMBRES D'ONDES CORRESPONDANTS SONT INDIQUES SOUS CHAQUE MODE DE VIBRATION.	67
FIGURE II- 5 : ILLUSTRATION DU PRINCIPE DE LA LOI DE BEER-LAMBERT.....	67
FIGURE II- 6 : COMPORTEMENT DU FAISCEAU IR A L'INTERFACE CRISTAL / MILIEU EXTERIEUR. LES DETAILS DU CHAMP ELECTRIQUE DE LA RADIATION ELECTROMAGNETIQUE EN UN POINT DE REFLEXION, A L'INTERFACE CRISTAL / MILIEU EXTERIEUR SONT REPRESENTES. UNE ONDE PROGRESSIVE, APPELEE ONDE EVANESCENTE, EST CREE ET PERMET DE SONDER L'ECHANTILLON EN CONTACT AVEC LE CRISTAL.....	69
FIGURE II- 7 : SCHEMA DU PRINCIPE DE L'ACCESSOIRE ATR DIAMANT DURASAMPLIR AVEC TROIS REFLEXIONS (THERMO OPTEK CORPORATION, NICOLET INSTRUMENT, TRAPPES, FRANCE).....	72
FIGURE II- 8 : SCHEMA DE LA CELLULE A CIRCULATION ATR. LA FLECHE A L'INTERIEUR DE LA CELLULE REPRESENT LE SENS DE CIRCULATION DES DIFFERENTES SOLUTIONS / SUSPENSIONS AUXQUELLES EST EXPOSE LE CRISTAL.....	73
FIGURE II- 9 : PHOTOGRAPHIE DU MONTAGE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DES EXPERIENCES DE FORMATION ET SUIVI DE BIOFILMS.....	74
FIGURE II- 10 : PRINCIPE DE LA DIFFUSION RAMAN.....	78
TABLEAU II- 1 : EVOLUTION DE D_p (μM) DE L'ONDE EVANESCENTE A LA SURFACE DE DEUX CRISTAUX ATR, EN FONCTION DU NOMBRE D'ONDE.....	70
TABLEAU II- 2 : EVOLUTION DE LA PROFONDEUR DE PENETRATION EFFECTIVE, D_e , DE L'ONDE EVANESCENTE A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM, EN FONCTION DU NOMBRE D'ONDE (μM).....	71
TABLEAU II- 3 : PRINCIPALES PROPRIETES DES CRISTAUX ATR DE DIAMANT ET ZNSE (2 ^E COLONNE) ET DES CRISTAUX ATR DE GERMANIUM (3 ^E COLONNE) UTILISES.....	73

Chapitre III
Phases de croissance et
empreintes spectrales IR et
Raman de *Pseudomonas*
fluorescens sous forme
planctonique

Sommaire du chapitre III

III – I. Courbes de croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	89
III – II. Analyse des culots bactériens par IRTF	92
III – II.1. Empreintes spectrales de culots et attributions.....	92
III – II.2. Comparaison des spectres en transmission et en ATR.....	97
III – II.3. Evolution des empreintes IR bactériennes au cours des phases de croissance.....	100
III – II.3.1. Région située entre 1750 et 1500 cm ⁻¹	102
III – II.3.2. Région située entre 1200 et 1000 cm ⁻¹	102
III – II.3.3. Région située entre 3000 et 2800 cm ⁻¹	104
III – III. Analyse des culots par microspectrométrie Raman	109
III – III.1. Profil général d'un spectre bactérien et attribution.....	109
III – III.2. Evolution du profil spectral de <i>P. fluorescens</i> aux différentes phases de croissance.....	115
III – IV. Apports des deux techniques pour l'analyse des culots de <i>P. fluorescens</i>	117
Références bibliographiques du chapitre III	119
Table des illustrations du chapitre III.....	123

Afin de comprendre la réponse potentielle d'un jeune biofilm de *Pseudomonas fluorescens*, aux variations de la quantité de carbone organique dissous (COD), présente/ajoutée dans l'eau, *via* son empreinte spectrale IRTF-ATR (chapitre V), il nous a été nécessaire d'établir, dans un premier temps, les empreintes spectrales de *P. fluorescens* à l'état planctonique. Les cellules bactériennes sont prélevées à différentes phases de croissance et analysées par spectroscopie infrarouge en transmission, en ATR et en microspectrométrie Raman. Les données ainsi collectées serviront de référence pour suivre l'adhésion de cette bactérie et les changements l'accompagnant.

III - I. Courbes de croissance de *Pseudomonas fluorescens*

Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance de *P. fluorescens*, dans du milieu nutritif LB à 25 g/L, en mesurant, au cours du temps, la densité optique, à 620 nm, des suspensions inoculées. La courbe de croissance obtenue est présentée sur la Figure III- 1.

On peut y distinguer six phases, numérotées de 1 à 6. Elles correspondent respectivement à la phase de latence (de 0 à 1h), à une « pseudo » phase d'accélération de la croissance (de 1 à 2h), à la phase exponentielle (de 2 à 7h), à la phase de décélération (de 7 à 110h), à une phase quasi-stationnaire (de 110 à 500h) et au début de la phase de déclin (dès 500h).

La courbe de croissance de *P. fluorescens* a également été établie par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC). Elle est présentée sur la Figure III- 2.

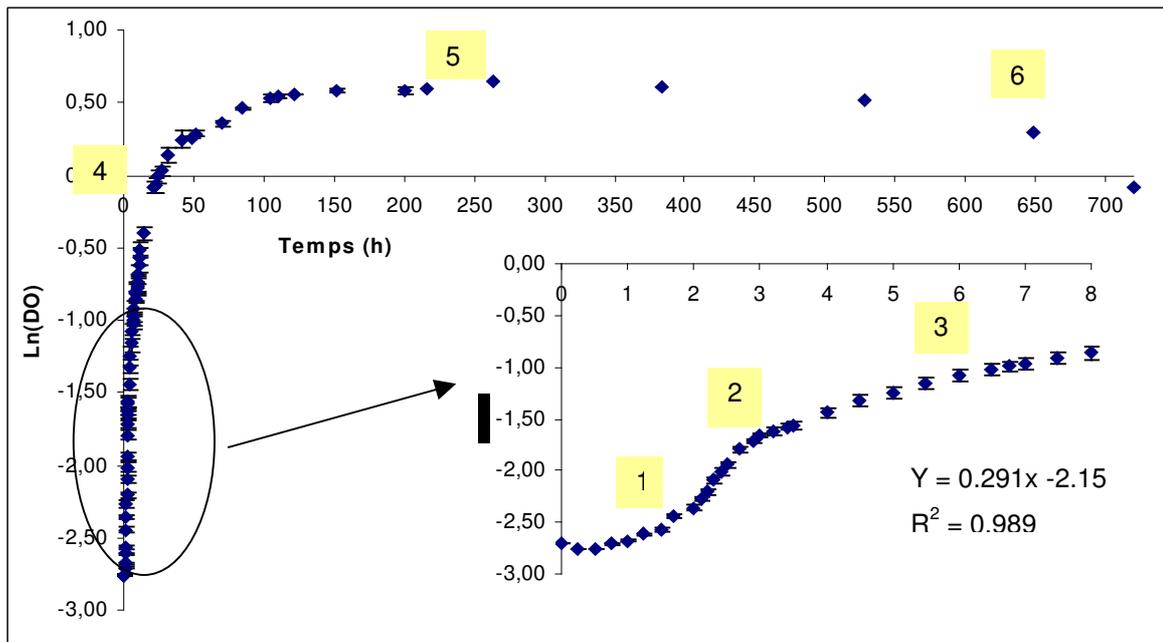


Figure III- 1 : Courbe de croissance de *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13 (moyenne sur 3 essais), obtenue par mesure de la DO à 620 nm, dans du bouillon LB à 25 g/L, à 27±1°C, après une pré-culture dans le même milieu nutritif durant 24 h. Un agrandissement de la cinétique entre 0 et 12 h est présenté dans l'encart.

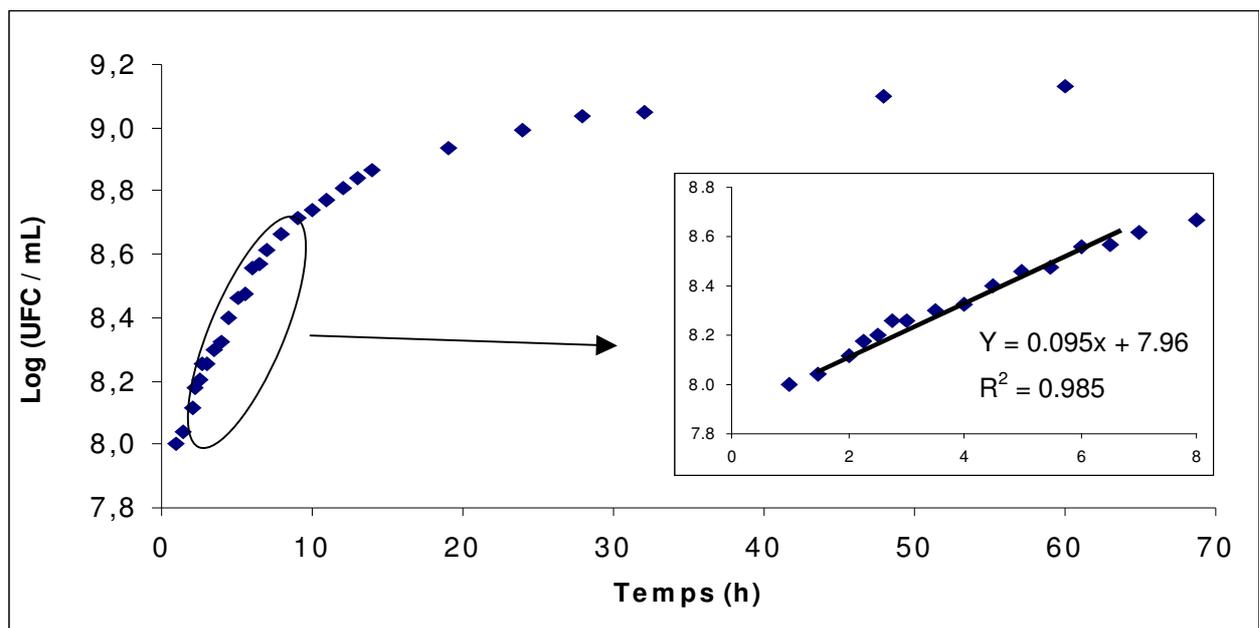


Figure III- 2 : Courbe de croissance de *P. fluorescens*, obtenue par dénombrement des UFC, et régression linéaire effectuée sur la partie de la courbe correspondant à la phase exponentielle. Un agrandissement de l'évolution des UFC entre 0 et 8 h est représenté en insertion.

A partir des courbes obtenues Figure III- 1 et Figure III- 2 nous avons déterminé le taux de croissance (c.f. chapitre I) de *P. fluorescens* dans nos conditions expérimentales. Une régression linéaire effectuée sur la partie correspondant à la phase exponentielle (soit entre 2 et 7 h) nous conduit à des taux de croissance similaires : à savoir 0,29 et 0,32 h⁻¹

selon qu'il est déterminé respectivement à partir de la mesure de la DO et du dénombrement des UFC. Ces valeurs sont en accord avec celles relatées par Delaquis et *al.*¹ et Korber et *al.*² qui trouvent respectivement un taux de croissance de 0,33 et 0,49 h⁻¹, pour des souches de *P. fluorescens*, à l'état planctonique, cultivées en milieu TSB (Tryptic Soy Broth). D'autres travaux dont ceux de Lebert et *al.*³ ont montré l'influence des conditions de culture : ainsi, lorsque les milieux nutritifs sont caractérisés par une activité de l'eau égale à 1, une température de 25°C, un pH de 7,0, le taux de croissance moyen de *P. fluorescens*, en milieu TMB (Tryptic Meat Broth), peut varier de 0,77 à 2,5 h⁻¹.

La comparaison de la Figure III- 1 et de la Figure III- 2 montre cependant deux différences :

- la première concerne la « pseudo » phase d'accélération absente dans le cas du dénombrement des UFC. Cette observation peut être reliée au fait que les cellules bactériennes fraîchement inoculées dans le milieu LB ont subi un stress ce qui est susceptible d'entraîner une modification de la mesure de la DO, suite à une modification possible de leur taille. Un tel comportement a été relaté par François et *al.*⁴ : les facteurs de stress environnementaux tels que le pH, l'activité de l'eau, la température peuvent fortement affecter la corrélation entre les mesures de DO et d'UFC.
- la seconde est relative aux temps d'atteinte de la phase stationnaire : elle débute respectivement à partir de 110 h et 40 h sur les courbes de croissance établies à partir de la mesure de la DO et du comptage des UFC. Des résultats similaires ont été rapportés par C. Rubio⁵ qui évoque l'interférence possible des EPS sécrétées par les bactéries lors de la mesure de la DO. Une autre explication peut concerner la technique employée : le dénombrement par UFC ne comptabilise que les cellules viables et cultivables alors que les mesures de DO résultent de la diffusion de la lumière par l'ensemble des cellules, viables ou non.

Enfin, en accord, avec Lebert et *al.*³, la DO augmente faiblement mais continûment, durant la phase stationnaire, ce qui peut laisser supposer que les cellules souffrent d'un manque d'oxygénation.

Nos résultats montrent que les courbes de croissance sont reproductibles dans nos conditions de culture. Pour la suite de notre étude, nous collecterons *P. fluorescens* à

différentes phases de croissance afin d'établir leurs profils spectraux sous forme planctonique.

III - II. Analyse des culots bactériens par IRTF

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, la spectroscopie IR permet, grâce à une signature spectrale propre à chaque microorganisme, de caractériser et différencier diverses espèces bactériennes⁶⁻⁸. Deux types de modes IR ont été utilisés : le mode ATR pour des culots bactériens hydratés et le mode transmission pour des culots lyophilisés et pastillés dans du KBr. Le premier met l'accent, a priori, sur le profil biochimique essentiellement de surface des bactéries alors que le second s'attache à la globalité de la composition biochimique des cellules. L'utilisation de la méthode ATR présente l'avantage de nous placer dans des conditions proches de celles qui ont été utilisées dans les manipulations de suivi *in situ* des biofilms.

III - II.1. Empreintes spectrales de culots et attributions

Avant de discuter plus en détail les spectres IR collectés, nous proposons, dans un premier temps, de donner un exemple du profil spectral IR caractéristique de *P. fluorescens*.

La Figure III- 3 présente les spectres IR typiques, en transmission et ATR, d'un culot de *P. fluorescens* CIP 69.13 obtenu à partir de cellules bactériennes prélevées en phase de décélération de la croissance, soit après 24 h de culture dans du bouillon LB à 25 g/L. Le culot recueilli a été divisé en deux parties : l'une a été déposée, à l'aide d'une Pspipette stérile, à la surface du cristal ATR diamant tandis que l'autre a été lyophilisée puis, 2 mg de la poudre obtenue ont été mélangés dans 198 mg de KBr, en poudre, pour obtenir une pastille qui a été analysée en transmission. Le spectre ATR a été enregistré immédiatement après avoir déposé le culot hydraté à la surface du cristal diamant.

Ce type de données, typiques des empreintes bactériennes, ont fait l'objet d'une littérature abondante et les principales bandes ont été attribuées⁹ et sont reportées sur les spectres^{6,10}. Cependant, il est nécessaire de souligner que même si les principaux constituants à telle ou telle bande ont été identifiés, la complexité de certains massifs tels que celui situé entre 1150 et 1000 cm^{-1} demeure.

N.B. : Dans la suite du manuscrit, nous désignerons ce massif par le nom 'PS'. De plus, en raison des problèmes de condensation, d'adsorption, la gestion de la vapeur d'eau et la connaissance de sa quantité dans les échantillons ne sont pas aisées. L'eau a donc été soustraite des spectres en se basant sur l'harmonique située à 2200cm^{-1} : un spectre d'eau enregistré au cours de l'expérience a été soustrait du spectre présenté de telle manière à obtenir un profil plat à 2200cm^{-1} .

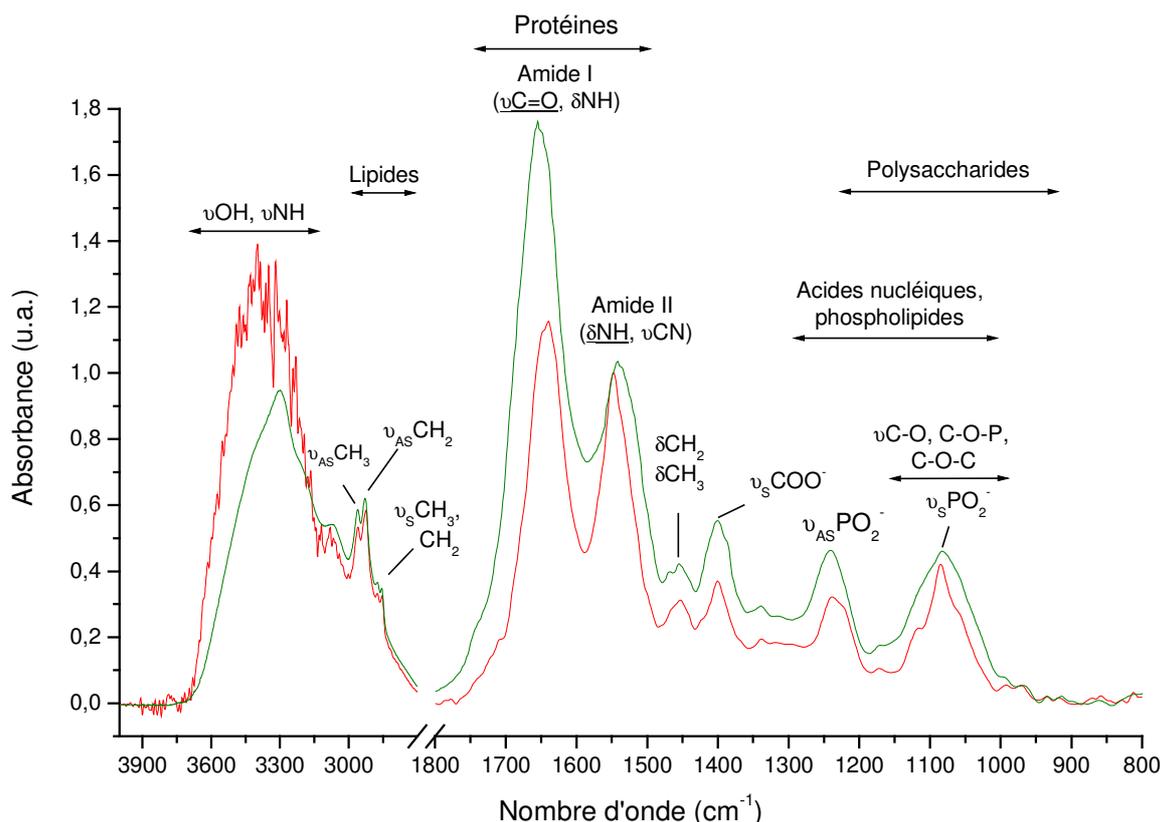


Figure III- 3 : Spectres IR d'un culot de *P. fluorescens* CIP 69.13, enregistrés en transmission (vert) et en ATR (rouge). Les cellules bactériennes ont été collectées après 24h de croissance dans du milieu LB à 25g/L. L'eau ainsi que la vapeur d'eau ont été soustraites du spectre ATR. Le spectre enregistré en mode ATR a été corrigé en fonction de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. La ligne de base des deux spectres a été corrigée et ils ont été normés par rapport à la bande amide II (1548cm^{-1}). Les principales attributions ont été reportées.

Quelle que soit la technique considérée (transmission ou ATR), le profil spectral global fait apparaître les principaux groupes de biomolécules présentes dans les bactéries, à savoir : les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides.

La région située entre 4000 et 3000 cm^{-1} est dominée principalement par les vibrations des amines présentes dans les acides nucléiques (adénine, guanine et/ou cytosine) et

protéines. On peut également supposer la présence de molécules d'eau sous forme liée, présente à l'intérieur des cellules bactériennes.

Concernant la région située entre 3000 et 2800 cm^{-1} , les absorptions sont attribuées principalement aux élongations C-H des groupements CH_n des chaînes aliphatiques.

Dans la région comprise entre 1800 et 1500 cm^{-1} se retrouvent les vibrations des groupements esters (1736 cm^{-1}) présents dans les lipides et les acides gras. On remarquera également deux absorptions très intenses caractéristiques de la liaison peptidique CONH, à savoir les bandes amides I et II situées respectivement à 1650 et 1548 cm^{-1} ¹¹⁻¹³. D'autres absorptions, plus faibles, pourraient aussi provenir du peptidoglycane et des acides nucléiques (vibration des liaisons C=O, C=N et C=C des bases).

La région située entre 1500 et 1300 cm^{-1} est caractéristique des déformations CH_2 et CH_3 , ainsi que des élongations des groupements carboxylates.

En ce qui concerne la région située entre 1300 et 1200 cm^{-1} , elle est dominée par l'absorption des acides nucléiques (ARN et ADN) à 1240 cm^{-1} mais également des phosphodiesteres et phospholipides.

Enfin, le massif situé entre 1200 et 900 cm^{-1} résulte de contributions diverses telles que celles des polysaccharides, du peptidoglycane et des lipopolysaccharides. On note également la présence de bandes reliées aux acides nucléiques (ARN, ADN), aux phosphodiesteres, aux pyrophosphates, et aux phospholipides. Seules les protéines ne contribuent pas à l'absorption observée dans cette région.

Des attributions plus précises sont proposées dans le Tableau III- 1. Les fréquences indiquées sont déduites de la dérivée seconde des spectres de culots de *P. fluorescens* prélevées en fin de phase exponentielle de croissance.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)		Vibrateurs	Principaux « contributeurs » Composés ou/et groupements fonctionnels
Pastille KBr Transmission	Culot hydraté ATR		
3300-3400		v OH associé, v NH ₂ libre	
~ 3300		v NH (amides A et B)	protéines
3197			
3062		v CH, v _s CH ₂	aromatiques, alcènes
2961	2961	v _a CH ₃	chaînes d'acides gras
2925	2925	v _a CH ₂	
2897	2897	v CH tertiaire	
2874	2874	v _s CH ₃	
2854	2854	v _s CH ₂	
1746	1747	v C=O	esters de lipides
1714	1713	v C=O	esters, acides carboxyliques
1700 – 1580		v C=O, v C=N, v C=C, δ NH	bases de l'ADN / ARN
1696		amide I (v <u>C=O</u> couplée à δ N-H)	protéines dans une conformation de type coudes β ou feuillet anti-parallèles
1691	1693		
1681			
1679	1678		
	1670		
1658	1660	amide I (v <u>C=O</u> couplée à δ N-H)	protéines en hélice α
1640	1641	amide I (v <u>C=O</u> couplée à δ N-H), δ H ₂ O	protéines en pelote statistique, eau
1629	1627	amide I (v <u>C=O</u> couplée à δ N-H)	protéines en feuillet β
1576	1578	v _a COO-	
	1568	amide II (δ <u>N-H</u> couplée à v C-N)	protéines
1555	1553		
1544	1546		
1533	1531		
1518			

1511	1512	ν C=C	Tyrosine
1500		noyau aromatique	
1497	1498		Phénylalanine
1491	1491	$\delta_{\text{cisaillement}} \text{CH}_2$	
1469	1471	$\delta_{\text{cisaillement}} \text{CH}_2$,	lipides
1455	1455	$\delta_{\text{a}} \text{CH}_3$	
1441	1443		
1416	1420, 1414	δ C-O-H	
1400	1400	$\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$	acides aminés, chaînes d'acides gras,
1385, 1375	1387, 1374	$\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$	
1353	1352	δCH , $\delta_{\text{torsion}} \text{CH}_2$	
1339	1339		
1314	1317	δ_{torsion} , balancement CH_2 , Amide III ($\nu_{\text{C-N}}$ couplée à δ N-H)	chaînes d'acides gras, protéines
1288	1281	amide III ($\nu_{\text{C-N}}$ couplée à δ N-H)	protéines
1239	1239	$\nu_{\text{a}} \text{PO}_2^-$	phosphodiester, phospholipides, LPS, acides nucléiques
1220	1218		
1200-900		ν C-O, ν C-C, δ C-O-H, δ C-O-C	polysaccharides
1173	1172	$\nu_{\text{s}} \text{C-OH}$	protéines, carbohydrates
1153	1153		
1117	1120	$\nu_{\text{s}} \text{CC}$	ARN, ADN
1084	1086	$\nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$	phosphodiester, phospholipides, LPS, acides nucléiques
1057	1056	$\nu_{\text{s}} \text{C-O-C}$, $\nu_{\text{s}} \text{P-O-C}$ (R-O-P-O-R')	polysaccharides
1039	1041	$\nu_{\text{O-H}}$ couplée à δ C-O	groupements COH dans les polysaccharides
1028	1026	CH_2OH	PS (glycogène)
964	970	ν C-C, ν P-O-P	squelette du ribose

Tableau III- 1 : Tentative d'attribution des spectres d'absorption IR de culots bactériens en fin de phase exponentielle de croissance^{10,11,14-23}

III - II.2. Comparaison des spectres en transmission et en ATR

L'observation des spectres IR d'un même culot bactérien, à l'état hydraté (ATR) et lyophilisé (transmission), met en évidence des différences concernant la position, l'intensité et la largeur à mi-hauteur de certaines bandes. Les spectres présentés sur la Figure III-3 ont été normés par rapport à la bande amide II. Or, lorsque l'échantillon bactérien est hydraté, cette bande présente un léger décalage vers les hauts nombres d'onde (elle passe de 1541 à 1547 cm^{-1}) ainsi qu'une largeur à mi-hauteur plus faible. De ce fait, nous avons re-traité ces deux spectres en les normant cette fois par rapport à la bande centrée à 2925 cm^{-1} , moins sujette aux modifications engendrées par l'état de l'échantillon (Figure III- 4).

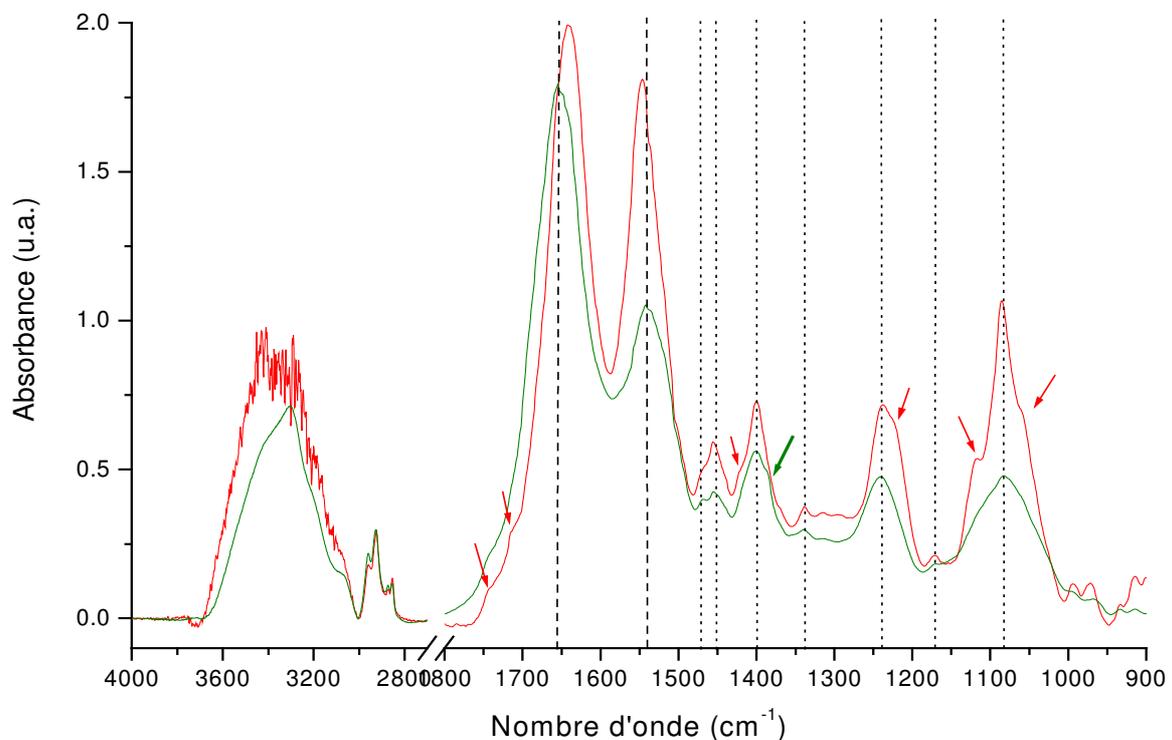


Figure III- 4 : Spectres IR d'un culot de *P. fluorescens* CIP 69.13, enregistrés en transmission (vert) et en ATR (rouge). Les cellules ont été collectées après 24 h de croissance dans du milieu LB à 25 g/L. L'eau ainsi que la vapeur d'eau ont été soustraites du spectre ATR. La ligne de base des deux spectres a été corrigée et ils ont été normés par rapport à la bande centrée à 2925 cm^{-1} . Les flèches rouges indiquent l'apparition d'un épaulement sur le spectre ATR et les vertes l'indique sur le spectre en transmission.

Les bandes amides I et II sont plus intenses, sur le spectre ATR, tout en ayant une largeur de bande à mi-hauteur plus faible quand l'échantillon est hydraté.

De telles observations ont également été relatées par Pevsner et Diem²⁴ qui attribuent ces changements à la solvation des groupements amides par les molécules d'eau ainsi qu'à des effets d'orientation des protéines par rapport à la surface du cristal. Sachant d'une part, que nous ne pouvons pas effectuer la correction ATR avec précision et d'autre part que l'échantillon est ici plus complexe, nous pouvons supposer qu'à cet effet d'orientation viennent s'ajouter les contributions d'autres composants tels que le peptidoglycane et les acides nucléiques. Ces multiples contributions sont mises en évidence lorsque l'on tente une décomposition du massif situé entre 1700 et 1480 cm^{-1} présentée sur la Figure III- 5. Les positions des onze Gaussiennes utilisées et numérotées de 1 à 11, ont été déterminées à l'aide de la dérivée seconde des spectres.

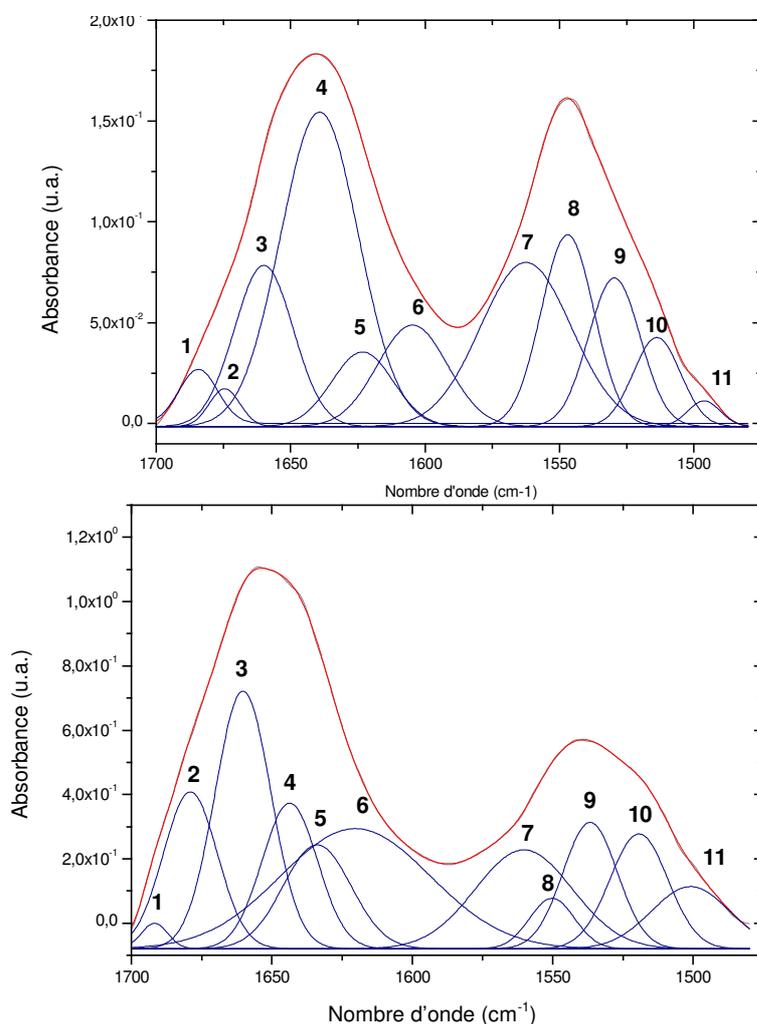


Figure III- 5 : Décomposition des bandes amides I et II présentes dans les spectres IR en mode ATR (haut) et transmission (bas) du culot de *P. fluorescens* en fin de phase exponentielle de croissance.

L'aire des onze Gaussiennes, exprimée en pourcentage par rapport à l'aire totale du massif, est indiquée dans le tableau III- 2.

Composante n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aire (%) ATR	1	4,9	8,9	11,6	17,2	8,2	5,3	28,3	10,9	1,3	2,4
Aire (%) Transmission	5,3	7,7	8	2,6	11,1	20,7	8,1	9,3	16,7	9,7	0,8

Tableau III- 2 : Aire des différentes Gaussiennes constituant le massif situé entre 1700 et 1480 cm^{-1} .

Elles sont centrées à 1496, 1513, 1529, 1547, 1562, 1604, 1623, 1639, 1659, 1674 et 1684 cm^{-1} sur le spectre ATR. Il est à noter qu'un décalage compris entre 2 et 15 cm^{-1} vers les hauts nombres d'ondes apparaît lors de la décomposition du spectre en transmission.

Il faut noter, en outre, que la diminution et l'augmentation respectives, en fréquence, des bandes amides I et II entre les états lyophilisé et hydraté, peut être la conséquence, comme le soulignent Mourant et *al.*²⁵ d'une altération de la structure secondaire des protéines par lyophilisation. Ce changement en fréquence peut aussi refléter une augmentation de l'intensité des liaisons hydrogène vu que d'une part, la bande amide II correspond en partie à δNH et que, d'autre part, la fréquence des vibrations de déformation NH augmente en présence de liaisons hydrogène. Par ailleurs, la diminution en fréquence de la bande 'amide I' de l'état lyophilisé à l'état hydraté est due aussi en partie à la contribution plus importante de la bande de déformation de l'eau aux alentours de 1639 cm^{-1} comme on peut le voir sur la Figure III- 5.

Une augmentation significative de l'intensité de la bande centrée à 1080 cm^{-1} ainsi que l'apparition d'un épaulement à 1220 cm^{-1} , sur le spectre ATR du culot hydraté, indique un déplacement de la fréquence d'élongation antisymétrique de PO_2^- , des acides nucléiques et des phospholipides, de 1240 à 1220 cm^{-1} lorsque l'échantillon est hydraté. Ces observations sont en parfait accord avec notamment les études de Pevsner et Diem²⁶ et Arrondo et Goni²⁷.

En comparant les deux spectres d'un même culot, en transmission et ATR, il apparaît clairement que les différences relevées en ce qui concerne notamment les profils (aires (c.f. tableau III-2), largeur à mi-hauteur, position) des bandes situées dans les régions entre 1750 et 1500 cm^{-1} d'une part et entre 1300 et 1000 cm^{-1} , d'autre part, sont dues essentiellement à un effet d'hydratation. Par ailleurs, compte tenu de la taille des bactéries (0,4 x 2,5 μm), et de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, on peut affirmer que l'on détecte par les deux méthodes quasiment la même chose, c'est-à-dire, l'ensemble de la cellule dans le cas de culots bactériens déposés sur cristal ATR diamant.

III - II.3. Evolution des empreintes IR bactériennes au cours des phases de croissance

Les spectres IR de culots de *P. fluorescens*, collectées à différentes phases de croissance, ont été enregistrés en mode ATR et transmission. Ils sont présentés sur la Figure III- 6.

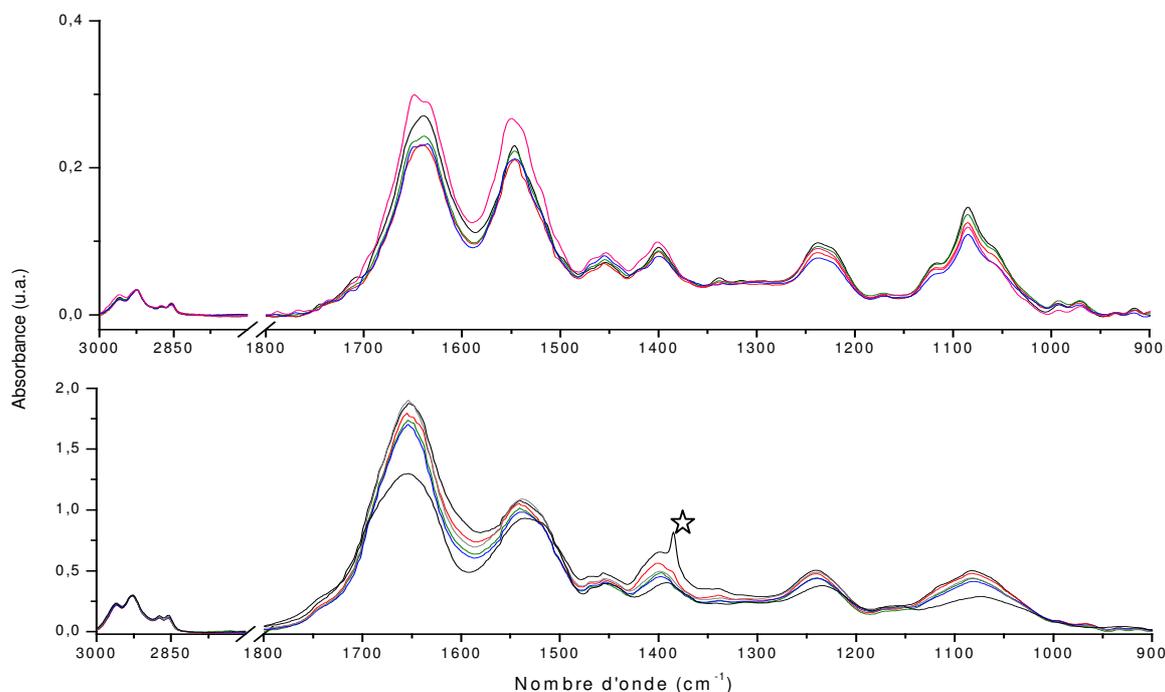


Figure III- 6 : Spectres de culots de *P. fluorescens* CIP 69.13, enregistrés en transmission (bas) et en ATR (haut), au cours des phases de croissance. Les spectres ont été normés par rapport à la bande centrée à 2925 cm^{-1} . Code des couleurs : noir = phase exponentielle (6 h), rouge = fin de phase exponentielle (24 h), vert = phase de décélération (48 h), bleu = phase stationnaire (4 j) et rose = phase stationnaire (8 j). L'étoile indique la présence d'une bande parasite 1384 cm^{-1} attribuée aux sels d'ammonium quaternaires présents dans le KBr.

Les cellules prélevées aux différentes phases de croissance présentent des spectres IR qui semblent *a priori* très similaires, à l'exception de la bande fine centrée à 1384 cm^{-1} , sur les spectres en transmission et qui est due en fait à la contribution de sels d'ammonium quaternaires présents dans le KBr. En fait, si l'on y regarde d'un peu plus près, notamment en faisant appel à divers outils mathématiques tel que la dérivée seconde (Figure III-7 et Figure III-8), on s'aperçoit que le profil spectral évolue en fonction du temps de croissance. L'étude approfondie de ces évolutions ne constituant toutefois pas l'objet premier de ce travail, celle-ci n'a été réalisée que partiellement, faute de temps. C'est pourquoi nous donnons ci-dessous un coup de projecteur uniquement sur quelques uns de ces changements, indiqués par les traits en pointillés.

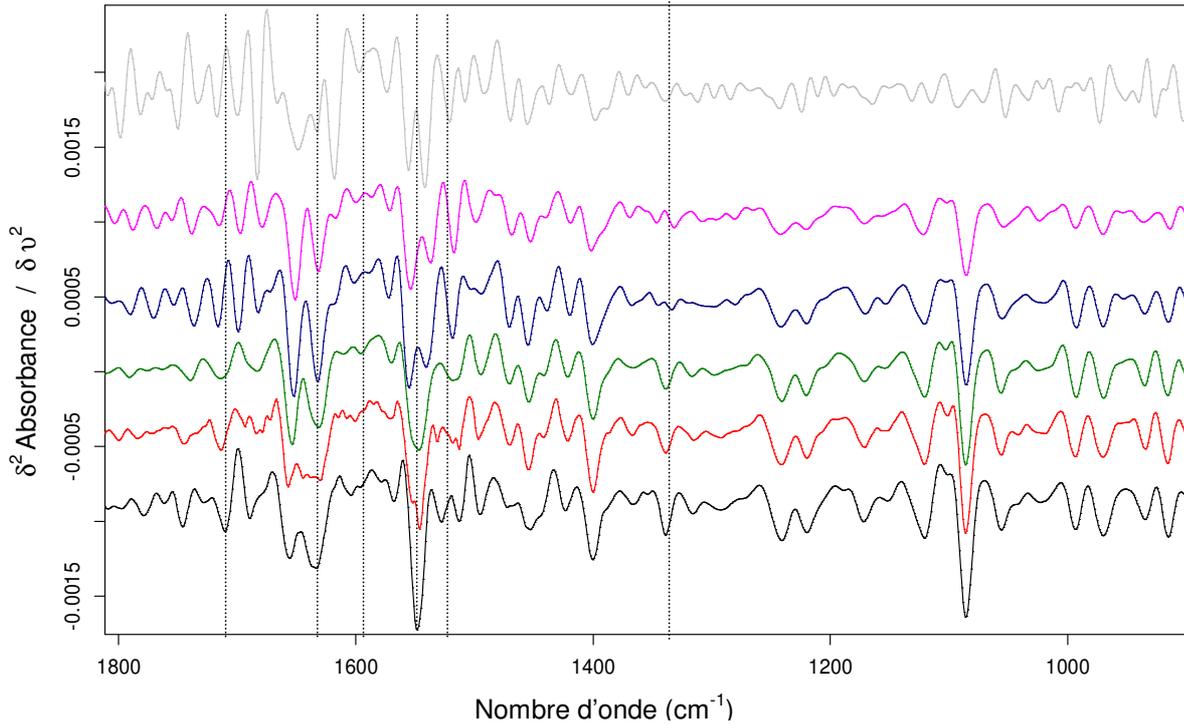


Figure III- 7 :Dérivée seconde des spectres IRTF-ATR au cours des phases de croissance entre 1800 et 900 cm^{-1} . De bas en haut : phase exponentielle (noir, 6 h), fin de phase exponentielle (rouge, 24 h), phase de décélération (vert, 48 h), phase stationnaire (bleu, 4 j et rose, 8 j) et phase de déclin (gris, 1 mois).

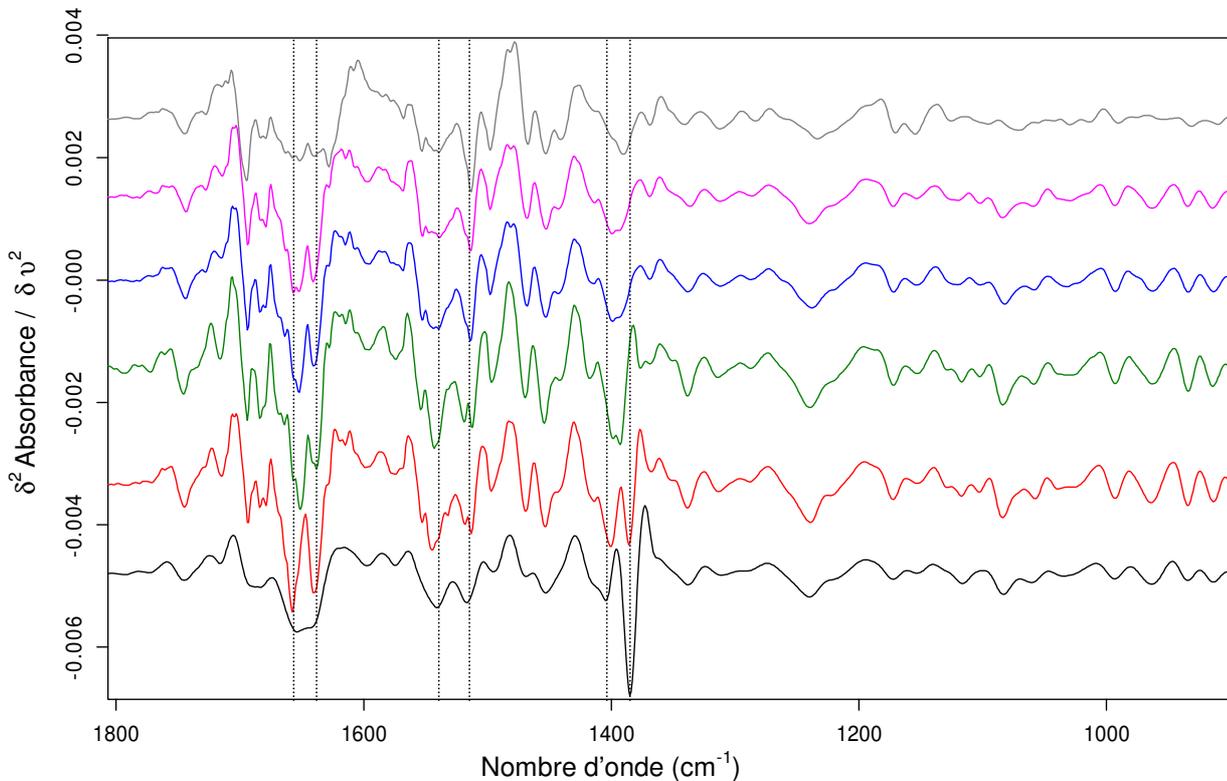


Figure III- 8 : Dérivée seconde des spectres IR en transmission au cours des phases de croissance entre 1800 et 900 cm^{-1} . De bas en haut : phase exponentielle (noir, 6 h), fin de phase exponentielle (rouge, 24 h), phase de décélération (vert, 48 h), phase stationnaire (bleu, 4 j et rose, 8 j) et phase de déclin (gris, 1 mois).

Parmi les zones les plus remarquables, on peut relever celles correspondant aux bandes amides I et II, aux polysaccharides et aux élongations CH₂, CH₃ (région non montrée ici).

III - II.3.1.Région située entre 1750 et 1500 cm⁻¹

La bande située à 1658 cm⁻¹ devient très marquée à 1 jour puis, disparaît progressivement au profit d'une à 1655 cm⁻¹. La bande centrée à 1651 cm⁻¹ demeure, quant à elle, toujours présente. Lorsque les protéines hélicoïdales sont associées aux membranes, une bande apparaît entre 1656 et 1658 cm⁻¹ ²⁸. Dans le cas de protéines solubles, elle apparaît entre 1650 et 1655 cm⁻¹. Les changements observés sur les spectres enregistrés pourraient donc indiquer une modification de la nature et de la structure des protéines se trouvant en surface de la bactérie. Une partie des protéines solubles resteraient présentes quelle que soit la phase de croissance tandis qu'une autre partie s'associerait aux membranes.

La fréquence et la largeur à mi-hauteur de la bande amide II varient au fur et à mesure de la croissance. Elle se déplace vers les hauts nombre d'onde (de 1541 à 1545 cm⁻¹) de la phase exponentielle à la phase stationnaire puis vers les plus bas (de 1545 et 1540 à 1538 cm⁻¹). Elle devient également plus large en phase stationnaire.

III - II.3.2.Région située entre 1200 et 1000 cm⁻¹

Après avoir corrigé la ligne de base entre ces deux points, huit Gaussiennes centrées à 1032, 1044, 1056, 1072, 1086, 1100, 1116 et 1168 cm⁻¹ ont été utilisées pour décrire l'évolution biochimique de *P. fluorescens*.

Un exemple de décompositions est présenté Figure III- 9.

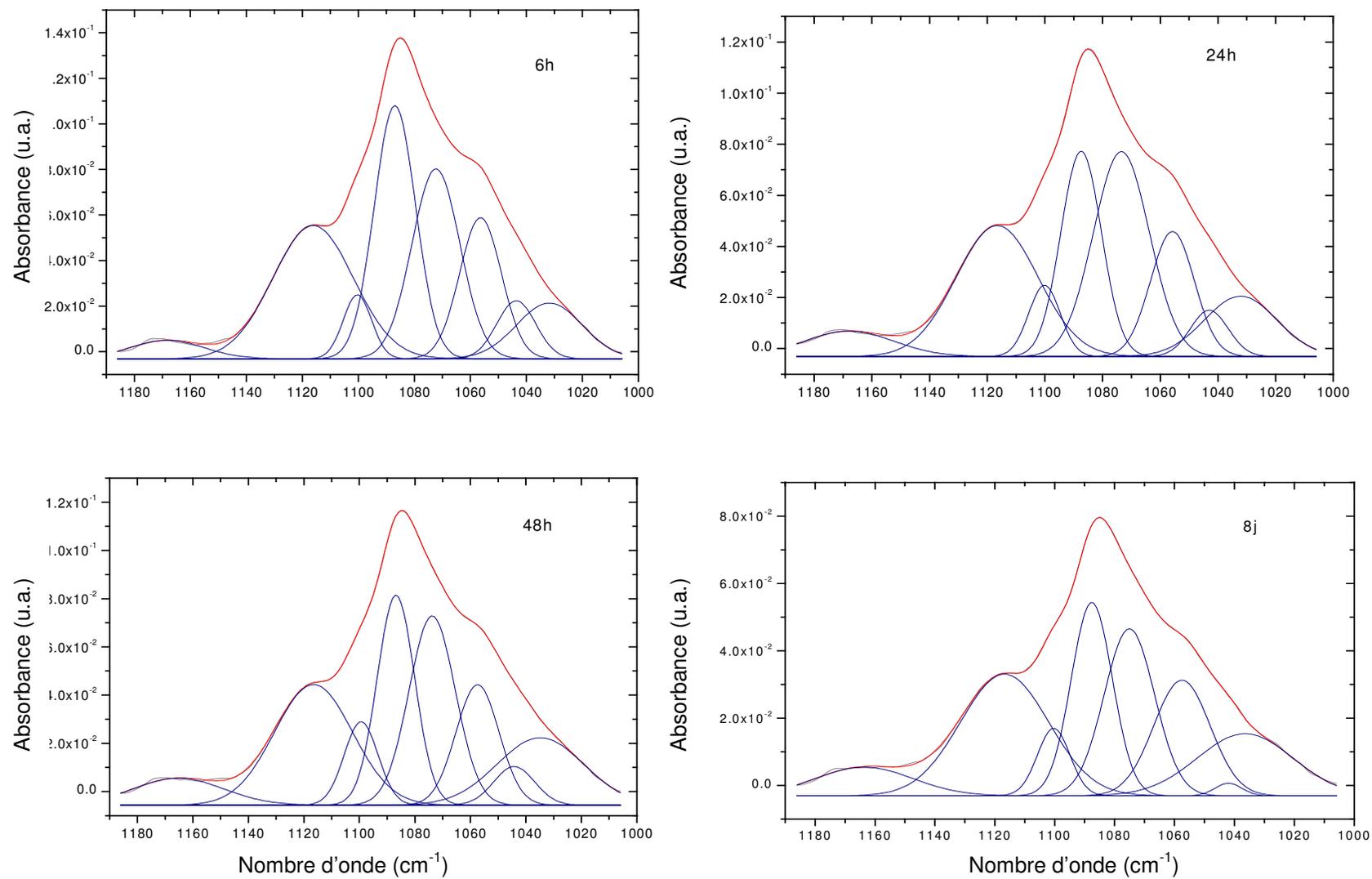


Figure III- 9 : Décomposition du massif centré à 1085 cm⁻¹ (spectres ATR), en huit Gaussiennes pour quatre temps de croissance : 6 h, 1 j, 2 j et 8 j

La région spectrale située entre 1200 et 1000 cm^{-1} regroupe principalement les contributions des acides nucléiques ainsi que des polysaccharides. L'analyse de la Figure III- 9 montre que :

- l'intensité des bandes situées entre 1200 et 1000 cm^{-1} est maximale lorsque les bactéries sont en phase exponentielle.
- les intensités des bandes diminuent après la phase exponentielle, sauf celles des bandes centrées à 1072 et 1086 cm^{-1} qui diminuent lorsque la phase stationnaire est entamée (8 jours)
- l'intensité de la bande centrée à 1044 cm^{-1} diminue considérablement en phase stationnaire (8 jours).

Ces variations suggèrent que la synthèse d'ADN, ARN est maximale en phase exponentielle (observation à relier avec l'aire de la bande à 1242 cm^{-1} qui diminue également au cours du temps). Cette dernière hypothèse peut être mise en corrélation avec la variation d'intensité du massif lipidique situé entre 3000 et 2800 cm^{-1} .

III - II.3.3.Région située entre 3000 et 2800 cm^{-1}

La dérivée seconde des spectres ATR collectés à différentes phases de croissance révèle l'existence d'au moins cinq bandes (Figure III- 10 et Figure III- 11).

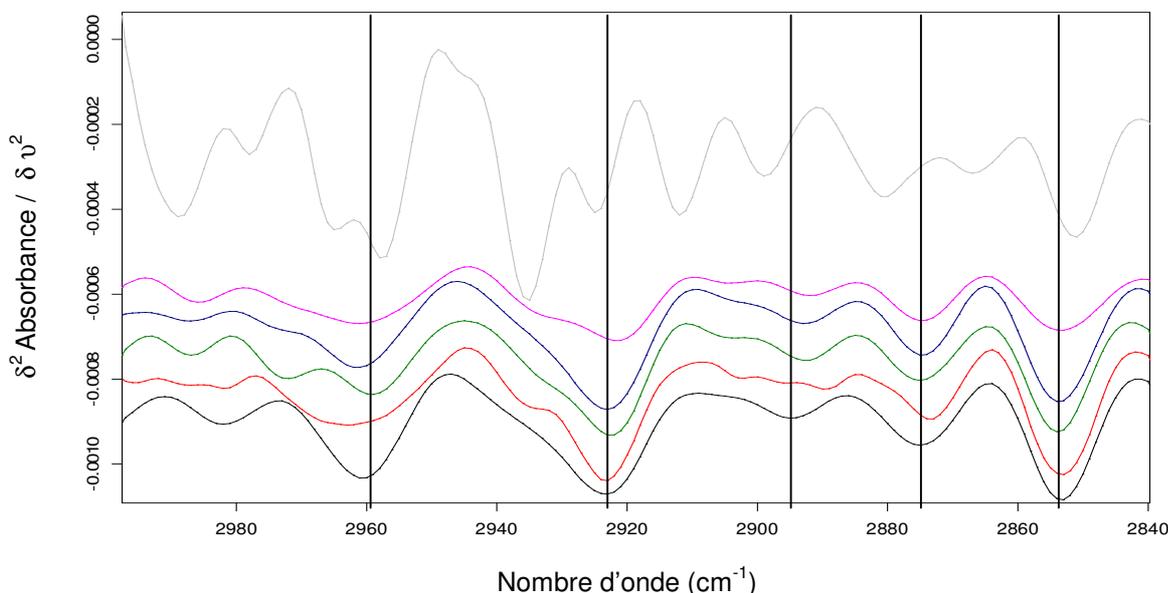


Figure III- 10 : Dérivée seconde des spectres IRTF-ATR au cours des phases de croissance entre 3000 et 2840 cm^{-1} . De bas en haut : phase exponentielle (noir, 6 h), fin de phase exponentielle (rouge, 24 h), phase de décélération (vert, 48 h), phase stationnaire (bleu, 4 j et rose, 8 j) et phase de déclin (gris, 1 mois).

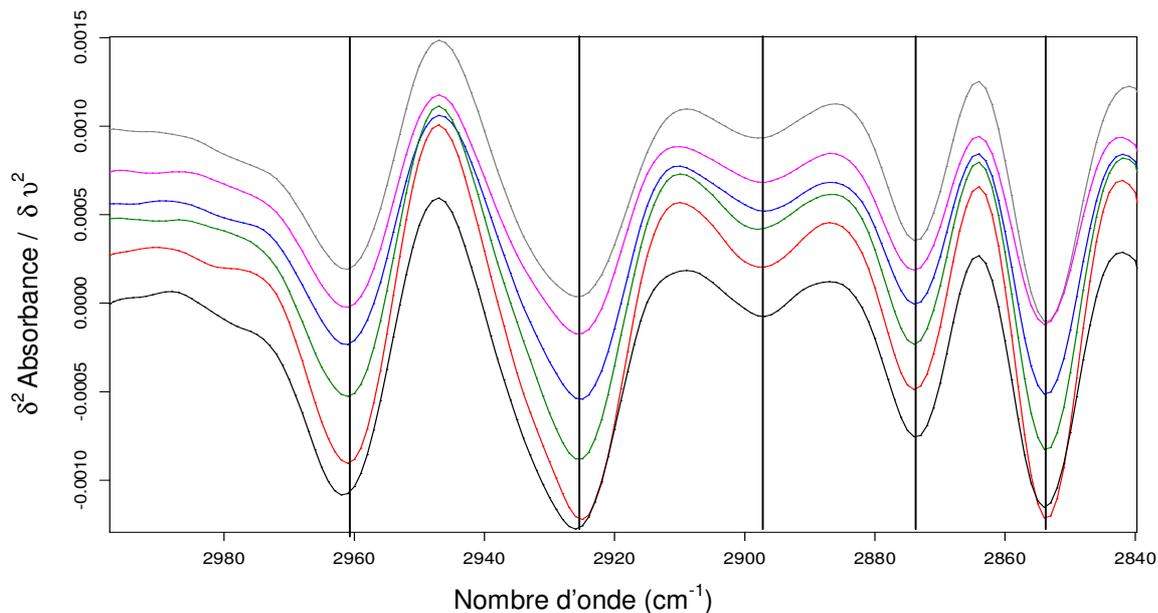


Figure III- 11 : Dérivée seconde des spectres IR en transmission au cours des phases de croissance entre 3000 et 2840 cm^{-1} . De bas en haut : phase exponentielle (noir, 6 h), fin de phase exponentielle (rouge, 24 h), phase de décélération (vert, 48 h), phase stationnaire (bleu, 4 j et rose, 8 j) et phase de déclin (gris, 1 mois).

La comparaison des dérivées secondes des spectres en ATR et transmission montre la présence, au minimum, de cinq bandes communes. Il s'agit des bandes centrées à 2960, 2924, 2873, 2854 et 2897 cm^{-1} (Figure III- 12). Aux vibrations d'élongation symétriques et antisymétriques de CH_2 et CH_3 , vient s'ajouter la contribution νCH (à 2897 cm^{-1}).

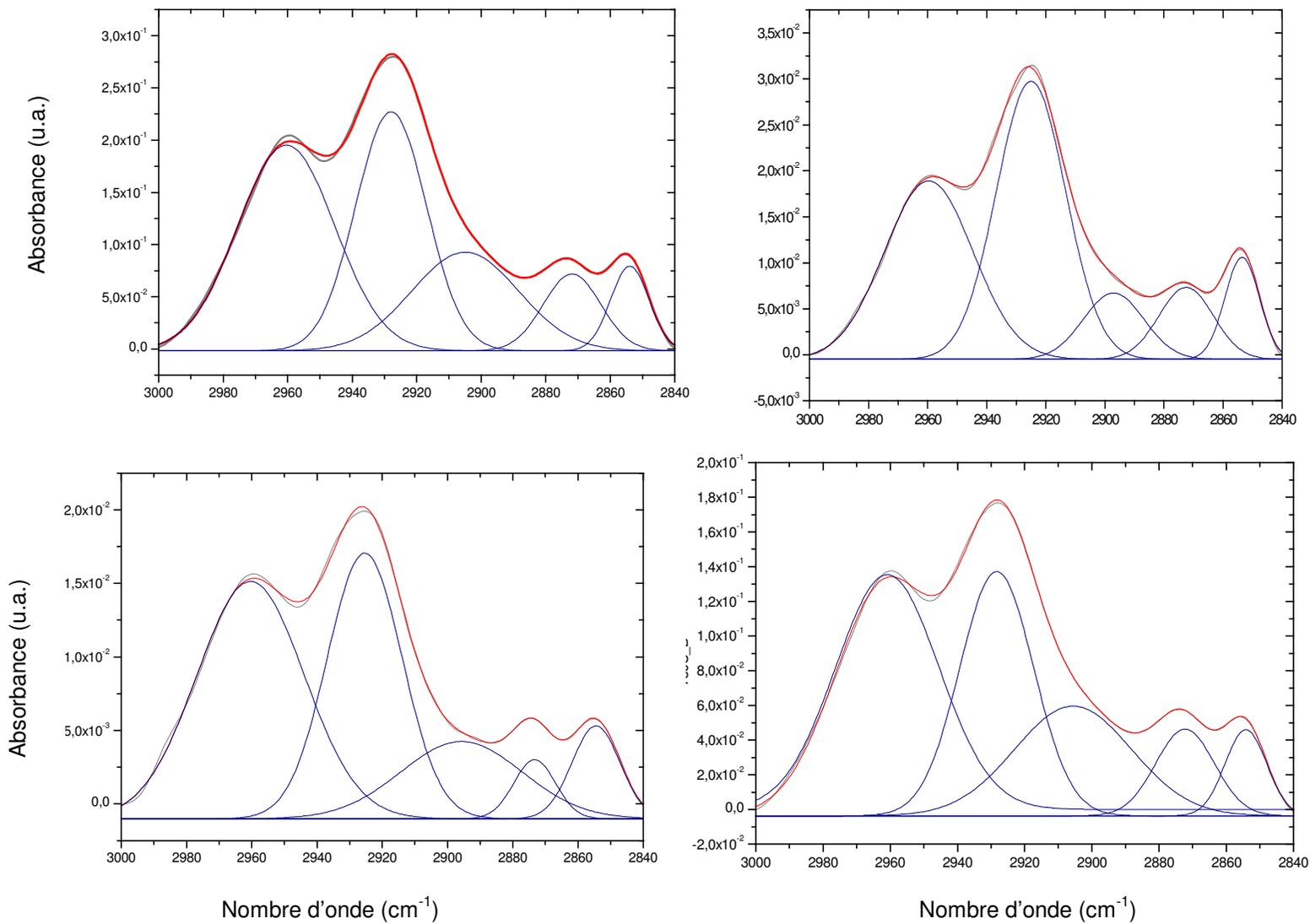


Figure III- 12 : Décomposition du massif compris entre 3000 et 2840 cm⁻¹ en cinq Gaussiennes, sur un spectre en transmission (à gauche) et en ATR (à droite) enregistrés après 1 j (haut) et 8 j (bas) de culture dans du LB à 25 g/L.

Aucun déplacement en fréquences n'est observable en ce qui concerne les spectres en transmission et ce quelle que soit la phase de croissance considérée.

En revanche, les bandes centrées à 2892 et 2987 cm^{-1} , sur les spectres ATR enregistrés entre 6 h et 8 j, subissent un déplacement vers les hauts nombres d'onde. Ces bandes passent de 2982 à 2987 cm^{-1} et de 2889 à 2892 cm^{-1} entre 1 jour et 2 jours. La phase de déclin se distingue des précédentes par un glissement de la position de toutes les bandes vers des nombres d'onde plus bas dans le cas des bandes centrées à 2851 et 2958 cm^{-1} , et vers des nombres plus hauts dans le cas des bandes centrées à 2881, 2898, 2925 et 2988 cm^{-1} . La bande de vibration d'élongation CH_2 située à 2850 cm^{-1} est souvent utilisée pour sonder l'état (ordre / désordre) des membranes biologiques. Il semblerait d'après nos observations que les membranes des bactéries en phase de déclin soient plus ordonnées que celles des autres phases. La bande centrée à 2925 cm^{-1} indiquerait, quant à elle, l'effet inverse ce qui serait plus en accord avec les phénomènes se produisant lors de cette phase : la lyse cellulaire ainsi que la mort des cellules.

Conclusion :

De nombreuses études, dont celle réalisée par Jiang et *al.*²⁹ ou Gué et *al.*³⁰, concernant la comparaison de spectre IR d'extraits subcellulaires (membranes, ADN, cytosol) purifiés avec ceux de cellules intactes ont montré une similitude entre les deux. A l'aide de ces données, l'attribution des bandes présentes sur spectres IR des culots de *P. fluorescens* a été réalisée. Les classes chimiques dominantes et présentes, quelle que soit la phase de croissance de la bactérie sont les lipides, les protéines, les carbohydrates ainsi que les acides nucléiques.

Des différences peuvent cependant exister concernant les composants mineurs et leur structure. La comparaison des spectres acquis en transmission et en ATR, dans le cas de *Pseudomonas fluorescens*, montre l'influence du mode de préparation de l'échantillon bactérien : sa déshydratation introduit des modifications des structures secondaires des protéines, de conformation de l'ADN, ARN. La comparaison des résultats obtenus grâce à ces deux modes IR montre que la région polysaccharidique révèle le plus de changements d'une phase de croissance à l'autre.

La spectrométrie Raman constitue la suite de ce chapitre. Contrairement à l'infrarouge, les

informations sont recueillies localement et permettent dès lors d'accéder aux modifications intervenant au niveau de la cellule bactérienne durant les différentes phases de croissance.

III - III. Analyse des culots par microspectrométrie Raman

Contrairement à la spectroscopie IR, la spectrométrie Raman a connu un essor plus tardif. Bien que déjà utilisée dans les années 50-60, son utilisation pour l'identification des microorganismes en microbiologie ne date que des années 80.

Les suspensions bactériennes ainsi que les films déshydratés de microorganismes ont fait l'objet d'études dont celles réalisées par Williams et Edwards³¹. D'autres travaux tels que ceux entrepris par le groupe de Puppels^{32,33} ont mené à l'identification microbienne grâce à l'utilisation de la spectroscopie Raman sur un échantillon ayant un volume d'environ $1\mu\text{m}^3$. Des cellules isolées ont également été le centre d'intérêt de chercheurs comme Schuster et al.^{34,35}.

Le recours à un montage de micro-Raman confocal permet d'analyser une cellule isolée comme le discutent Rosch et al.^{36,37}. Ainsi, un très petit nombre de microorganismes est-il nécessaire pour l'obtention de données spectroscopiques fiables, et en conséquence, un temps de culture réduit ce qui favorise son utilisation dans les domaines médicaux³².

Les spectres Raman présentés dans ce paragraphe constituent une première approche. Ils permettent ainsi de montrer les possibilités offertes par l'utilisation de cette technique spectroscopique pour compléter les analyses IR.

III - III.1. Profil général d'un spectre bactérien et attribution

La Figure III- 13 présente un spectre d'un culot de *P. fluorescens* obtenu à partir de cellules prélevées en fin de phase exponentielle de croissance, ainsi que le spectre du milieu nutritif LB, obtenu en déposant successivement des gouttes de solution stérile de LB à 25 g/L à la surface d'un cristal de germanium.

Contrairement aux spectres d'absorption infrarouge, les bandes de vibration d'élongation et de déformation C-H dominent les spectres. Des bandes caractéristiques de certains acides aminés (aromatiques : Phe, Tyr, Trp) et acides nucléiques (vibrations des cycles des bases) sont également présentes. On note aussi l'existence de bandes intenses à

1311, 1362, 1584 cm^{-1} accompagnées d'une autre moins intense à 3170 cm^{-1} . Les trois premières bandes peuvent être attribuées à des vibrations de déformation CH et des vibrations de cycles aromatiques. La bande à plus haute fréquence est attribuable à une élongation N-H liée par liaison hydrogène. Le profil général des trois bandes à basse fréquence semble montrer qu'elles proviennent d'une exaltation par effet de résonance tout comme l'ont observé Naumann et *al.*⁷ ou encore Rösch et *al.*³⁸ pour d'autres bactéries. *P. fluorescens* est capable de synthétiser un pigment fluorescent, la pyoverdine, dont le spectre d'absorption dans le visible peut se prêter à ce type de phénomène de résonance. Cependant, le milieu nutritif LB n'est pas carencé en fer, condition nécessaire à la synthèse de ce pigment³⁹. Il apparaît donc peu probable que *P. fluorescens* produise de la pyoverdine dans nos conditions. La comparaison de ce spectre avec ceux correspondant aux caroténoïdes (bandes intenses vers 1516 et 1155 cm^{-1}) trouvés dans certaines bactéries^{7,38} révèle l'absence de tels composés.

On peut donc supposer qu'il s'agisse de bandes provenant du spectre du milieu LB.

Le milieu LB est composé, en grande partie, d'acides aminés⁴⁰. Parmi les bandes les plus intenses dominant le spectre du LB (figure III-13), on note une contribution majoritaire de trois acides aminés :

- la tyrosine (Tyr) : présence d'une bande à 1614 cm^{-1} et d'un doublet à 847 et 831 cm^{-1}
- la phénylalanine (Phe) : présence de bandes à 1606 et 1003 cm^{-1}
- le tryptophane (Trp) : présence d'une bande à 1366 cm^{-1} .

Leur présence est confirmée par les élongations des groupements carboxylates à 1591 et 1436 cm^{-1} ainsi que par les élongations des liaisons CH et C=CH vers 3062 et 2967 cm^{-1} caractéristiques de composés aromatiques.

Le profil spectral du milieu LB, en solution, correspond à celui d'acides aminés. La comparaison des spectres du milieu LB et du culot bactérien montre qu'ils sont différents.

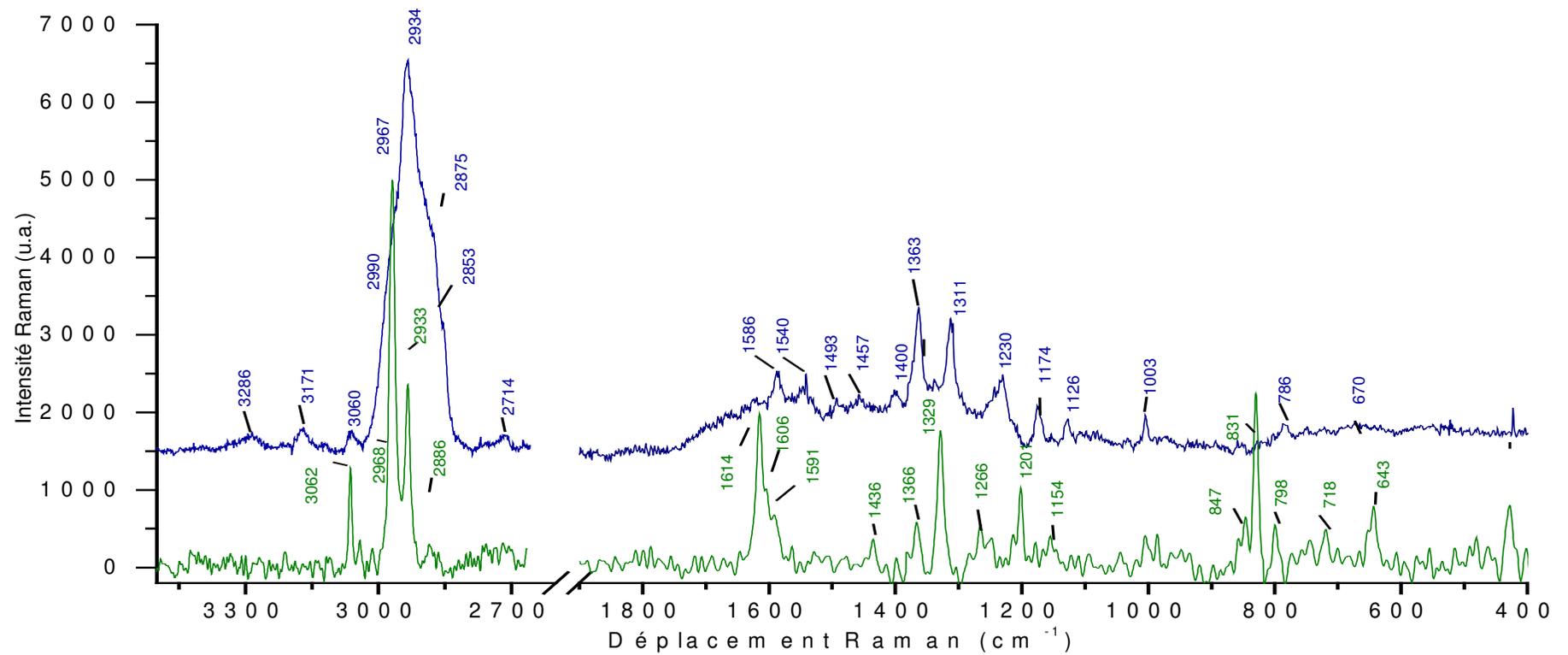


Figure III- 13 : Spectres de *P. fluorescens* (en haut, bleu) et de milieu de culture LB (25 g/L) séché, stérile sur cristal de germanium. Les principaux nombres d'onde (cm^{-1}) ont été indiqués sur les deux spectres.

Par comparaison avec un spectre IR de culot bactérien, les bandes les plus intenses des spectres infrarouge correspondent aux bandes amides I et II des protéines et aux élongations C-C et C-O des carbohydrates. Le Raman et l'IR offrent donc des informations complémentaires concernant l'échantillon analysé.

Une attribution plus détaillée des différentes bandes présentes sur les spectres de culots bactériens est proposée dans le Tableau III- 3.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Constituants biochimiques
	vOH	eau
3394	vOH, vNH ₂ associé	
3287	vNH associé (amide II)	
3216	vNH associé (amide II)	protéines
3172	vNH associé	
3149		
3122		
3062	vC=C-H arom	
2984	vCH _n	
2965	vCH ₃	lipides
2934	v _a CH ₂ , v _a CH ₃	lipides
2904	vCH _n	
2877	vCH ₂	lipides
2854	v _s CH ₂	acides gras, lipides
2760 ; 2717	combinaison (1440+1300 ?)	
1806		
1730	vC=O	ester
1700	vC=O	acides carboxyliques, acides nucléiques, protéines
		1630-1680 cm ⁻¹ : amide I
1664	amide I	1670 ± 3 : feuillet β 1665 ± 3 : structure désordonnée (solvatée)
	vC=C (391) amide I (317, 627)	lipides protéines (1655 ± 5 : hélice α)
1639	δH ₂ O amide I ?	
1622	amide I ?	
1607	vC=C arom	Tyr (1614 cm ⁻¹) + Phe (1606 cm ⁻¹)

1585	$\nu\text{C}=\text{C}$ arom , νaCOO	Tyr, Phe
	amide II $\nu\text{C}=\text{C}$ $\nu\text{C}=\text{C}$ cycle	protéines A, G
1565	$\nu\text{C}=\text{C}$ cycle ?	
1545	amide II	
1532		
1525		
1492	A, G	acides nucléiques
	A, G	acides nucléiques
1457	δCH_2	
	δCH_2	lipides
1436	δCH_2	lipides
1400	$\nu_s\text{COO}$	protéines
1378	T, A, G	Acides nucléiques
1363	cycle indole	Trp dans les protéines
1346		
1338	δCH A	Trp acides nucléiques
1311	δCH ?	
		domaine entre 1220 et 1290 : amide III
	amide III	protéines > 1275 cm^{-1} : hélice α
	amide III $\delta_{\text{ip}}=\text{C}-\text{H}$	protéines lipides
1243	amide III N-H, C-N	aléatoire 1245 \pm 4 : (large) structure désordonnée
1232	amide III U ?	1235 \pm 3 : feuillet β
1216	amide III	protéines (aléatoire)
	Tyr, Phe	protéines
	A, G, C	acides nucléiques
1173	Tyr, Phe	protéines
	$\nu\text{C}-\text{O}$ et $\nu\text{C}-\text{N}$	
1153		
	$\nu\text{C}-\text{C}$; $\nu\text{C}-\text{O}$; δCOH	domaine entre 1030 et 1130 : carbohydrates

1128	$\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-O}$ $\nu\text{C-N}$, $\nu\text{C-C}$ $\nu=\text{C-C}=\text{C}$	carbohydrates protéines acides gras insaturés dans les lipides
	$\nu\text{C-N}$	Protéines
1093 (large)	$\nu\text{C-C}$ squelette et C-O-C du lien glycosidique 1,4 $\nu\text{C-N}$ νSPO_2	carbohydrates protéines acides nucléiques
	$\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-O-C}$	lien glycosidique des carbohydrates
	$\nu\text{C-O}$ $\nu\text{C-N}$	protéines
	$\nu\text{C-N}$ $\nu\text{C-O}$	protéines
1033	$\nu\text{C-C}$; $\nu\text{C-O}$; δCOH	carbohydrates
1004	respiration de cycle aromatique	Phe dans les protéines
978	$\nu\text{C-C}$ squelette	protéines
852	$\nu\text{C-C}$ cycle aromatique (+ bande à 830 cm^{-1} normalement) νCOC lien glycosidique 1,4	Tyr dans les protéines (852 cm^{-1} : Tyr grillée, 829 cm^{-1} : Tyr) carbohydrates
	C-O-P-O-C	ARN (squelette)
784	respiration de cycle pyrimidine $\nu\text{S O-P-O}$ diester	C, T, U : acides nucléiques acides nucléiques
749	thymine (T) cycle $\nu\text{S O-P-O}$ Trp $\nu\text{C-S}$	ADN groupes de tête des phospholipides protéines protéines
668 (large)	$\nu\text{C-S}$; respiration de cycle aromatique G, T	protéines Tyr dans les protéines (624 cm^{-1}) pour Phe acides nucléiques
555 (large)	δCOC $\nu\text{S-S}$	carbohydrates (cycle glycosidique) protéines
422	squelette	carbohydrates

Tableau III- 3 : Tentative d'attribution des spectres de diffusion Raman de culots bactériens en fin de phase exponentielle de croissance^{8,41-50}

III - III.2. Evolution du profil spectral de *P. fluorescens* aux différentes phases de croissance

La Figure III- 14 présente la superposition de spectres de culots de *P. fluorescens* à différentes phases de croissance.

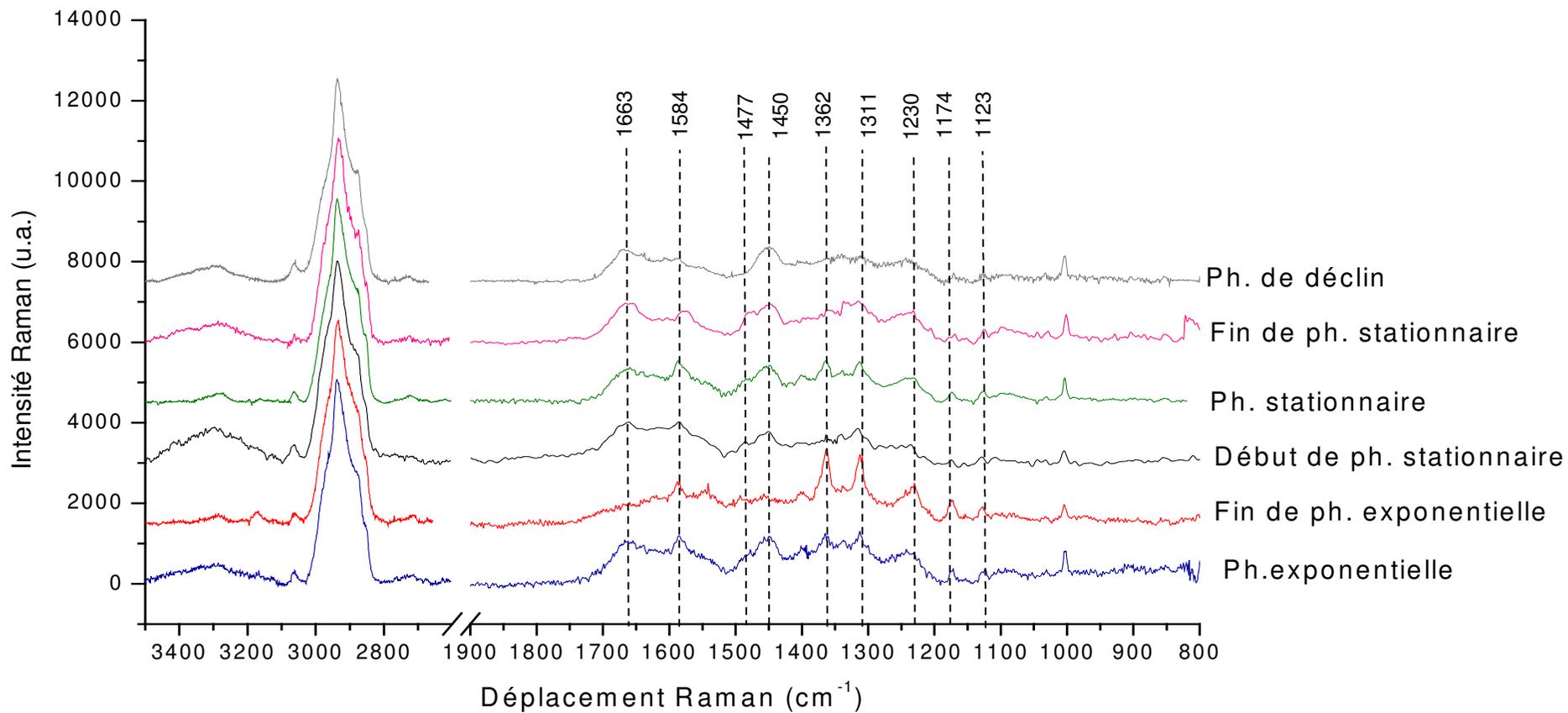


Figure III- 14: Evolution des spectres de *P. fluorescens* en fonction des phases de croissance pour un même échantillon: de la phase exponentielle (bas) à la phase de déclin (haut). Spectres normés par rapport à la bande C-H la plus intense centrée à 2937 cm^{-1} . (Abbréviation : ph = phase)

Quelle que soit la phase de croissance étudiée, on retrouve quatre bandes centrées à 1311, 1362, 1584 et 3170 cm^{-1} qui semblent être intimement liées car leurs intensités relatives restent constantes d'une phase à l'autre. La comparaison des intensités de ces bandes avec celles de la phénylalanine (à 1002 cm^{-1}) et de la bande amide I ne montre aucune corrélation, au cours d'une même phase de croissance. Ces quatre bandes ne sont donc pas attribuées à des protéines. Par ailleurs, un lavage des bactéries avant enregistrement du spectre de diffusion ne modifie pas le spectre et permet d'écarter l'hypothèse de la présence résiduelle de milieu nutritif LB.

Les autres parties des spectres montrent des bandes attribuées aux protéines (Figure III- 14, Tableau III- 3) comme celles centrées à 1002, entre 1275 et 1200, 1660 et à 3063 cm^{-1} respectivement attribuables à la respiration de cycle de la phénylalanine, à la bande amide III, à la bande amide I et aux élongations C-H de carbones aromatiques⁸.

Les acides nucléiques, dont les bandes de vibration caractéristiques des bases purines (guanine et adénine) à 1575 cm^{-1} et 1477 cm^{-1} sont en partie occultées par la présence des bandes intenses discutées ci-dessus, sont présentes sur tous les spectres sauf celui du culot de bactéries en phase de déclin. Ce dernier montre surtout un profil spectral correspondant à des protéines.

L'évolution des spectres Raman enregistrés aux différentes phases de croissance est délicate à observer à cause de l'exaltation de certaines bandes qui en masquent d'autres. En effet, la longueur d'onde excitatrice du laser est à 514 nm ce qui implique que l'on travaille en Raman résonant pour les chromophores absorbant autour de 514 nm (exaltation) et en non-résonant pour les autres. A ceci s'ajoute le fait que nous avons affaire à une évolution subtile des bandes dans les différents spectres. De telles observations ont également été rapportées par Neugebauer et *al.*⁵¹.

III - IV. Apports des deux techniques pour l'analyse des culots de *P. fluorescens*

Les spectres Raman de *P. fluorescens* sont dominés par les modes de vibration d'élongation et de déformation C-H, ainsi que par des bandes correspondant à certains acides aminés (Phe, Tyr, Trp) et acides nucléiques (vibrations des cycles des bases). Les

bandes amides I et II, caractéristiques des protéines, et les élongations C-C et C-O des carbohydrates apportent, quant à eux, une contribution majoritaire sur les spectres IR. Malgré une contribution de bandes plus faible dans les spectres Raman, on retrouve aussi, les bandes amide I et III.

Il est également nécessaire de remarquer que les culots bactériens peuvent subir des dommages suite au contact du laser (Raman). Cependant, les temps d'accumulation utilisés dans nos manipulations ont été assez courts pour préserver les échantillons analysés.

Au vue des surfaces/volumes analysés, les résultats, obtenus à l'aide des spectroscopies IR et Raman, nous permettent d'obtenir des renseignements complémentaires concernant la composition structurale et chimique de la souche testée, et ceci en fonction des phases de croissance bactérienne.

Le Tableau III- 4 propose une comparaison des deux techniques utilisées.

	Infrarouge (ATR)	Raman
Etat de l'échantillon	hydraté	Hydraté/sec
Surface/Volume analysés	tapis de bactéries sondées sur au maximum 1 à 1,5 couche (épaisseur sondée 0,6µm)	Cellule entière (individuelle)
Type informations recueillies	Colonisation latérale du cristal ATR Informations moyennes	Suivi de l'évolution de la composition biochimique des cellules Informations localisées
Analyse <i>in situ</i> ?	oui	possible
Analyse en temps réel?	oui	possible
Destruction de l'échantillon : durant sa préparation durant l'analyse	Non non	non possible
Informations quantitatives ?	oui	oui
Temps de la mesure	1 min	24 minutes

Tableau III- 4 : Caractéristiques des techniques spectroscopiques utilisées pour l'analyse des culots de *P. fluorescens*

Références bibliographiques du chapitre III

1. Delaquis P.J., Caldwell D.E., Lawrence J.R. & McCurdy A.R. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology* **18**, 199-210 (1989).
2. Korber, D.R., Lawrence J.R. & Caldwell, D.E. Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1421-1429 (1994).
3. Lebert I., Begot C. & Lebert A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C). *International Journal of Food Microbiology* **39**, 53-60 (1998).
4. Francois K. *et al.* Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1503-1515 (2005).
5. Rubio Céline. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. 1-214. 5-7-2002. Université de Paris VI. Ref Type: Thesis/Dissertation
6. Nauman D., Helm D. & Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**, 81-82 (1991).
7. Naumann, D., Keller, D., Helm, D., Schultz, C. & Schrader, B. FT-IR Spectroscopy and FT-Raman Spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. *Journal of Molecular Structure* **347**, 399-406 (1995).
8. Maquelin, K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **51**, 255-271 (2002).
9. Filip, Z. & Hermann, S. An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *European Journal of Soil Biology* **37**, 137-143 (2001).
10. Helm D. & Naumann D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* **126**, 75-80 (1995).
11. Kansiz M. *et al.* Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* **52**, 407-417 (1999).
12. Choo-Smith L.-P. *et al.* Investigating microbial micro(colony) heterogeneity by vibrational

- spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1461-1469 (2001).
13. Lin M. *et al.* Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 5769-5772 (2004).
 14. Wojtkowiak B. & Chabanel M. *Spectrochimie moléculaire*. Technique et Documentation, Paris (1977).
 15. Kamnev A.A. *et al.* Spectroscopic characterization of cell membranes and their constituents of the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Molecular Structure* **480-481**, 387-393 (1999).
 16. Solomon D., Lehmann J., Kinyangi J., Liang B. & Schafer T. Carbon K-edge NEXAFS and FTIR-ATR spectroscopic investigation of organic carbon speciation in soils. *Soil Science Soc American Journal* **69**, 107-119 (2005).
 17. Pradier C.-M. *et al.* Surface characterisation of three marine bacteria strains by FT-IR, XPS and ToF-SIMS, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *The Journal of Physical Chemistry* **109**, 9540-9549 (2005).
 18. Feo J.C., Castro M.A., Robles L.C. & Aller A.J. Fourier-transform infrared spectroscopic study of the interactions of selenium species with living bacterial cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 1601-1607 (2004).
 19. Schmitt J. & Flemming H.-C. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**, 1-11 (1998).
 20. Mourant J.R., Yamada Y.R., Carpenter S., Dominique L.R. & Freyer J.P. FTIR spectroscopy demonstrates biochemical differences in mammalian cell cultures at different growth stages. *Biophysical Journal* **85**, 1938-1947 (2003).
 21. Keirsse J. *et al.* Mapping bacterial surface population physiology in real-time: infrared spectroscopy of *Proteus mirabilis* swarm colonies. *Appl. Spectrosc.* **60**, 584-591 (2006).
 22. Zeroual, W. *et al.* Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1222**, 171-178 (1994).
 23. Boydston-White S., Gopen T., Houser S., Bargonetti J. & Diem M. Infrared spectroscopy of human tissue. V. Infrared spectroscopic studies of myeloid leukemia (ML-1) cells at different phases of the cell cycle. *Biospectroscopy* **5**, 219-227 (1999).
 24. Pevsner A. & Diem M. Infrared spectroscopic studies of major cellular components. Part I: the effect of hydration on the spectra of proteins. *Appl. Spectrosc.* **55**, 788-793 (2001).

25. Mourant J.R. *et al.* Methods for measuring the infrared spectra of biological cells. *Physics in Medicine and Biology* **48**, 243-257 (2003).
26. Pevsner A. & Diem M. Infrared spectroscopic studies of major cellular components. Part II: the effect of hydration on the spectra of nucleic acids. *Appl. Spectrosc.* **55**, 1502-1505 (2001).
27. Arrondo J.L.R. & Goni F.M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **96**, 53-68 (1998).
28. Chittur K.K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* **19**, 357-369 (1998).
29. Jiang W. *et al.* Elucidation of functional groups on Gram-positive and Gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Langmuir* **20**, 11433-11442 (2004).
30. Gué M., Dupont V., Dufour A. & Sire O. Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. *Biochemistry* **40**, 11938-11945 (2001).
31. Williams A.C. & Edwards H.G.M. Fourier transform Raman spectroscopy of bacterial cell walls. *Journal of Raman Spectroscopy* **25**, 673-677 (1994).
32. Maquelin, K. *et al.* Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal. Chem.* **72**, 12-19 (2000).
33. Puppels G.J. *et al.* Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectrometry. *Nature* **347**, 301-303 (1990).
34. Schuster, K.C., Urlaub, E. & Gapes, J.R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological Methods* **42**, 29-38 (2000).
35. Schuster, K.C., Reese I., Urlaub E., Gapes J.R. & Lendl B. Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Anal. Chem.* **72**, 5529-5534 (2000).
36. Rösch, P., Schmitt, M., Kiefer, W. & Popp, J. The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **661-662**, 363-369 (2003).
37. Rösch, P. *et al.* Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1626-1637 (2005).
38. Rosch P., Schmitt M., Kiefer W. & Popp J. The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* **661-662**, 363-369 (2003).
39. Philson S.B. & Llinas M. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. I- Isolation and

characterization. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 8081-8085 (1982).

40. Dionex Corporation. Determination of amino acids in cell cultures and fermentation broths. Application Note 150. 2003.
Ref Type: Report
41. Simons,L. *et al.* Laser Raman spectroscopy of amino acids, oligopeptides, polypeptides and enzymes. *Commentationes Physico-Mathematicae* **42**, 125-207 (1972).
42. Schuster,K.C., Reese I., Urlaub E., Gapes J.R. & Lendl B. Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Anal. Chem.* **72**, 5529-5534 (2000).
43. Maquelin,K. *et al.* Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal. Chem.* **72**, 12-19 (2000).
44. Spiro,T.G. & Gaber,B.P. Laser Raman scattering as a probe of protein structure. *Annual Review of Biochemistry* **46**, 553-572 (1977).
45. Chen,M.C. & Lord,R.C. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. VIII. Conformational study of bovine serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 990-992 (1976).
46. Krafft,C., Knetschke,T., Siegner,A., Funk,R.H.W. & Salzer,R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **32**, 75-83 (2003).
47. Schuster,K.C., Urlaub,E. & Gapes,J.R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological Methods* **42**, 29-38 (2000).
48. Huang,W.E., Griffiths,R.I., Thompson,I.P., Bailey,M.J. & Whiteley,A.S. Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. *Anal. Chem.* **76**, 4452-4458 (2004).
49. Huang W.E., Bailey M.J., Thompson I.P., Whiteley A.S. & Spiers A.J. Single-cell Raman spectral profiles of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 reflects *in vitro* and *in planta* metabolic history. *Microbial Ecology* **53**, 414-425 (2007).
50. Takai Y., Masuko T. & Takeuchi H. Lipid structure of cytotoxic granules in living human killer T lymphocytes studied by Raman microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1335**, 199-208 (1997).
51. Neugebauer U. *et al.* Towards a detailed understanding of bacterial metabolism - Spectroscopic characterization of *Staphylococcus epidermidis*. *ChemPhysChem* **8**, 124-137 (2007).

Table des illustrations du chapitre III

FIGURE III- 1 : COURBE DE CROISSANCE DE <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> CIP 69.13 (MOYENNE SUR 3 ESSAIS), OBTENUE PAR MESURE DE LA DO A 620 NM, DANS DU BOUILLON LB A 25 G/L, A 27±1°C, APRES UNE PRE-CULTURE DANS LE MEME MILIEU NUTRITIF DURANT 24 H. UN AGRANDISSEMENT DE LA CINETIQUE ENTRE 0 ET 12 H EST PRESENTE DANS L'ENCART.....	90
FIGURE III- 2 : COURBE DE CROISSANCE DE <i>P. FLUORESCENS</i> , OBTENUE PAR DENOMBREMENT DES UFC, ET REGRESSION LINEAIRE EFFECTUEE SUR LA PARTIE DE LA COURBE CORRESPONDANT A LA PHASE EXPONENTIELLE. UN AGRANDISSEMENT DE L'EVOLUTION DES UFC ENTRE 0 ET 8 H EST REPRESENTE EN INSERTION.....	90
FIGURE III- 3 : SPECTRES IR D'UN CULOT DE <i>P. FLUORESCENS</i> CIP 69.13, ENREGISTRES EN TRANSMISSION (VERT) ET EN ATR (ROUGE). LES CELLULES BACTERIENNES ONT ETE COLLECTEES APRES 24H DE CROISSANCE DANS DU MILIEU LB A 25G/L. L'EAU AINSI QUE LA VAPEUR D'EAU ONT ETE SOUSTRAITES DU SPECTRE ATR. LE SPECTRE ENREGISTRE EN MODE ATR A ETE CORRIGE EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DE PENETRATION DE L'ONDE EVANESCENTE. LA LIGNE DE BASE DES DEUX SPECTRES A ETE CORRIGEE ET ILS ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE AMIDE II (1548 CM ⁻¹). LES PRINCIPALES ATTRIBUTIONS ONT ETE REPORTEES.....	93
FIGURE III- 4 : SPECTRES IR D'UN CULOT DE <i>P. FLUORESCENS</i> CIP 69.13, ENREGISTRES EN TRANSMISSION (VERT) ET EN ATR (ROUGE). LES CELLULES ONT ETE COLLECTEES APRES 24 H DE CROISSANCE DANS DU MILIEU LB A 25 G/L. L'EAU AINSI QUE LA VAPEUR D'EAU ONT ETE SOUSTRAITES DU SPECTRE ATR. LA LIGNE DE BASE DES DEUX SPECTRES A ETE CORRIGEE ET ILS ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE CENTREE A 2925 CM ⁻¹ . LES FLECHES ROUGES INDIQUENT L'APPARITION D'UN EPAULEMENT SUR LE SPECTRE ATR ET LES VERTES L'INDIQUE SUR LE SPECTRE EN TRANSMISSION.....	97
FIGURE III- 5 : DECOMPOSITION DES BANDES AMIDES I ET II PRESENTES DANS LES SPECTRES IR EN MODE ATR (HAUT) ET TRANSMISSION (BAS) DU CULOT DE <i>P. FLUORESCENS</i> EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE.....	98
FIGURE III- 6 : SPECTRES DE CULOTS DE <i>P. FLUORESCENS</i> CIP 69.13, ENREGISTRES EN TRANSMISSION (BAS) ET EN ATR (HAUT), AU COURS DES PHASES DE CROISSANCE. LES SPECTRES ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE CENTREE A 2925 CM ⁻¹ . CODE DES COULEURS : NOIR = PHASE EXPONENTIELLE (6 H), ROUGE = FIN DE PHASE EXPONENTIELLE (24 H), VERT = PHASE DE DECELERATION (48 H), BLEU = PHASE STATIONNAIRE (4 J) ET ROSE = PHASE STATIONNAIRE (8 J). L'ETOILE INDIQUE LA PRESENCE D'UNE BANDE PARASITE 1384 CM ⁻¹ ATTRIBUEE AUX SELS D'AMMONIUM QUATERNAIRES PRESENTS DANS LE KBR.....	100
FIGURE III- 7 :DERIVEE SECONDE DES SPECTRES IRTF-ATR AU COURS DES PHASES DE CROISSANCE ENTRE 1800 ET 900CM ⁻¹ . DE BAS EN HAUT : PHASE EXPONENTIELLE (NOIR, 6 H), FIN DE PHASE EXPONENTIELLE (ROUGE, 24 H), PHASE DE DECELERATION (VERT, 48 H), PHASE STATIONNAIRE (BLEU, 4 J ET ROSE, 8 J) ET PHASE DE DECLIN (GRIS, 1MOIS).....	101

FIGURE III- 8 : DERIVEE SECONDE DES SPECTRES IR EN TRANSMISSION AU COURS DES PHASES DE CROISSANCE ENTRE 1800 ET 900 CM^{-1} . DE BAS EN HAUT : PHASE EXPONENTIELLE (NOIR, 6 H), FIN DE PHASE EXPONENTIELLE (ROUGE, 24 H), PHASE DE DECELERATION (VERT, 48 H), PHASE STATIONNAIRE (BLEU, 4 J ET ROSE, 8 J) ET PHASE DE DECLIN (GRIS, 1MOIS).....	101
FIGURE III- 9 : DECOMPOSITION DU MASSIF CENTRE A 1085 CM^{-1} (SPECTRES ATR), EN HUIT GAUSSIENNES POUR QUATRE TEMPS DE CROISSANCE : 6 H, 1 J, 2 J ET 8 J.....	103
FIGURE III- 10 : DERIVEE SECONDE DES SPECTRES IRTF-ATR AU COURS DES PHASES DE CROISSANCE ENTRE 3000 ET 2840 CM^{-1} . DE BAS EN HAUT : PHASE EXPONENTIELLE (NOIR, 6 H), FIN DE PHASE EXPONENTIELLE (ROUGE, 24 H), PHASE DE DECELERATION (VERT, 48 H), PHASE STATIONNAIRE (BLEU, 4 J ET ROSE, 8 J) ET PHASE DE DECLIN (GRIS, 1MOIS).....	104
FIGURE III- 11 : DERIVEE SECONDE DES SPECTRES IR EN TRANSMISSION AU COURS DES PHASES DE CROISSANCE ENTRE 3000 ET 2840 CM^{-1} . DE BAS EN HAUT : PHASE EXPONENTIELLE (NOIR, 6 H), FIN DE PHASE EXPONENTIELLE (ROUGE, 24 H), PHASE DE DECELERATION (VERT, 48 H), PHASE STATIONNAIRE (BLEU, 4 J ET ROSE, 8 J) ET PHASE DE DECLIN (GRIS, 1MOIS).....	105
FIGURE III- 12 : DECOMPOSITION DU MASSIF COMPRIS ENTRE 3000 ET 2840 CM^{-1} EN CINQ GAUSSIENNES, SUR UN SPECTRE EN TRANSMISSION (A GAUCHE) ET EN ATR (A DROITE) ENREGISTRES APRES 1 J (HAUT) ET 8 J (BAS) DE CULTURE DANS DU LB A 25 G/L.	107
FIGURE III- 13 : SPECTRES DE <i>P. FLUORESCENS</i> (EN HAUT, BLEU) ET DE MILIEU DE CULTURE LB (25 G/L) SECHE, STERILE SUR CRISTAL DE GERMANIUM. LES PRINCIPAUX NOMBRES D'ONDE (CM^{-1}) ONT ETE INDICUES SUR LES DEUX SPECTRES.	111
FIGURE III- 14: EVOLUTION DES SPECTRES DE <i>P. FLUORESCENS</i> EN FONCTION DES PHASES DE CROISSANCE POUR UN MEME ECHANTILLON: DE LA PHASE EXPONENTIELLE (BAS) A LA PHASE DE DECLIN (HAUT). SPECTRES NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE C-H LA PLUS INTENSE CENTREE A 2937 CM^{-1} . (ABBREVIATION : PH = PHASE)	116
TABLEAU III- 1 : TENTATIVE D'ATTRIBUTION DES SPECTRES D'ABSORPTION IR DE CULOTS BACTERIENS EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE ^{10,11,14-23}	96
TABLEAU III- 2 : AIRE DES DIFFERENTES GAUSSIENNES CONSTITUANT LE MASSIF SITUE ENTRE 1700 ET 1480 CM^{-1}	99
TABLEAU III- 3 : TENTATIVE D'ATTRIBUTION DES SPECTRES DE DIFFUSION RAMAN DE CULOTS BACTERIENS EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE ^{8,40-49}	114
TABLEAU III- 4 : CARACTERISTIQUES DES TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES UTILISEES POUR L'ANALYSE DES CULOTS DE <i>P. FLUORESCENS</i>	118

Chapitre IV
Suivi et analyse, par
spectroscopie vibrationnelle,
de l'adhésion de *P.fluorescens*
sur des cristaux ATR de
germanium

Sommaire du chapitre IV

IV – I. Empreintes spectrales IR de <i>P. fluorescens</i> adhérees à la surface du cristal ATR de germanium	130
IV – I.1. Rappel sur le dispositif expérimental servant au suivi de l'adhésion bactérienne.....	130
IV – I.2. Exemple d'une cinétique d'adhésion bactérienne.....	131
IV – I.3. Spectre de <i>P. fluorescens</i> adhérees à la surface du cristal ATR de germanium.....	132
IV – I.3.1. Région située entre 3600 et 3000 cm ⁻¹	134
IV – I.3.2. Région située entre 3000 et 2800 cm ⁻¹	134
IV – I.3.3. Région située entre 1750 et 1500 cm ⁻¹	134
IV – I.3.4. Région située entre 1500 et 1350 cm ⁻¹	136
IV – I.3.5. Région située entre 1350 et 1200 cm ⁻¹	136
IV – I.3.6. Région située entre 1200 et 900 cm ⁻¹	136
IV – I.3.7. Conclusion.....	137
IV – I.4. Corrélation Aire de la bande amide II – Nombre d'UFC.....	137
IV – II. Nature du film primaire obtenu à la surface du germanium par passage d'une solution stérile de LB	140
IV – II.1. Caractérisation des composés du milieu nutritif LB s'adsorbant à la surface des cristaux ATR de germanium.....	140
IV – II.2. Cinétique d'adsorption des composés du milieu LB à la surface du germanium.....	143
IV – III. Adhésion de <i>P. fluorescens</i> à la surface du cristal	144
IV – III.1. Influence de la présence d'un film primaire à la surface du germanium sur l'adhésion bactérienne.....	145
IV – III.2. Adhésion de <i>P. fluorescens</i> en fonction de la concentration en LB.....	146
IV – III.3. Influence de la concentration initiale bactérienne inoculée.....	148
IV – III.4. Influence du temps d'inoculation.....	149
IV – IV. Biofilm de référence	153
IV – IV.1. Synthèse des conditions expérimentales retenues pour la formation du biofilm modèle.....	153
IV – IV.2. Aspect macroscopique.....	153
IV – IV.3. Aspect microscopique.....	154
IV – IV.4. Artefacts liés aux expériences pouvant perturber les spectres bactériens.....	156
IV – V. Analyse de jeunes biofilms de <i>P. fluorescens</i> par microspectrométrie Raman	158
IV – V.1. Comparaison de spectres de <i>P. fluorescens</i> sous forme planctonique et sous forme sessile.....	158
IV – V.2. Comparaison de spectres de biofilms âgés de 5 h.....	160
Références bibliographiques du chapitre IV.....	165
Table des illustrations du chapitre IV.....	169

L'adhésion des bactéries, la formation du biofilm et son développement sont conditionnés par différents facteurs. Parmi les plus étudiés, on peut citer :

- Les conditions hydrodynamiques^{1 2} : elles déterminent les caractéristiques du transfert de matière (nutriments, bactéries) vers la surface, et également les forces de cisaillement, influençant ainsi l'épaisseur et la morphologie du biofilm.
- L'état physiologique et de ce fait la composition chimique des bactéries inoculées influence leur cinétique d'adhésion à une surface^{3 4}. La concentration initiale en bactéries peut aussi entrer en considération.⁵
- Les conditions nutritives, c'est-à-dire la composition en carbone, azote, hydrogène, oxygène de la suspension d'inoculation doivent favoriser le maintien et le développement des bactéries. Elles jouent également un rôle important dans l'élaboration du film primaire.
- Le pH et la force ionique du milieu d'inoculation⁶ jouent un rôle dans les mécanismes d'adsorption des bactéries en modifiant les double-couches électrostatiques du support et des microorganismes⁷.
- La température de la suspension d'inoculation intervient dans la vitesse de croissance bactérienne.
- La nature du support, et en particulier sa toxicité, influencent la vitesse de colonisation des bactéries et leur morphologie⁸. La présence de défauts de surface tels que les joints de grains dans les films d'oxydes recouvrant les aciers inoxydables favorisent l'attachement et le développement des bactéries⁹. La présence d'un film conditionnant ou non à la surface d'un matériau peut également s'avérer propice à la colonisation bactérienne¹⁰.

Parmi ces paramètres, nous en avons retenu quatre considérés comme majeurs par White et *al.*¹¹ : le pré-conditionnement de la surface du cristal, la concentration du milieu d'inoculation, la concentration initiale en bactéries et le temps d'inoculation. Le suivi par spectroscopie IRTF-ATR de l'évolution de l'aire de la bande amide II, utilisée comme marqueur de la biomasse¹² permettra de les optimiser.

Des analyses en microspectrométrie Raman et en microscopie à épifluorescence des jeunes biofilms obtenus donneront un aperçu de la structure, et notamment des hétérogénéités éventuelles au sein des échantillons.

Au cours de ce chapitre, nous allons être amenés à discuter de l'adhésion des cellules au cristal de germanium et en conséquence du concept 'biofilm'. Comme nous l'avons évoqué au chapitre I, cette notion recouvre différentes définitions, la plus générale étant de considérer un biofilm en tant qu'un microsysteme organisé de microorganismes englués dans une matrice de substances polymériques extracellulaires.

Ne connaissant pas, *a priori*, les résultats obtenus au cours de l'étude qui va suivre, nous emploierons le terme 'biofilm naissant' ou 'jeune biofilm' ou bien encore 'cellules adhérees' pour décrire notre systeme. Ceci permettra d'éviter toute ambiguïté en ce qui concerne les phénomènes se produisant à l'interface suspension/cristal ATR.

IV - I. Empreintes spectrales IR de *P. fluorescens* adhérees à la surface du cristal ATR de germanium

IV - I.1. Rappel sur le dispositif expérimental servant au suivi de l'adhésion bactérienne

Le circuit présenté au Schéma IV- 1 a été réalisé afin de suivre l'adhésion de *P. fluorescens*, en temps réel, *in situ*, de manière non destructive. Rappelons que la suspension inoculée est obtenue à partir de cellules bactériennes prélevées en fin de phase exponentielle de croissance.

Le montage expérimental, décrit en détails au chapitre II, est un circuit ouvert composé d'un flacon d'inoculation, d'une cellule ATR à circulation, d'une pompe péristaltique qui maintient le débit constant à 0,7 mL/min, et d'un flacon poubelle. Tous ces éléments sont reliés entre eux par des tubes en silicone autoclavés et désinfectés.

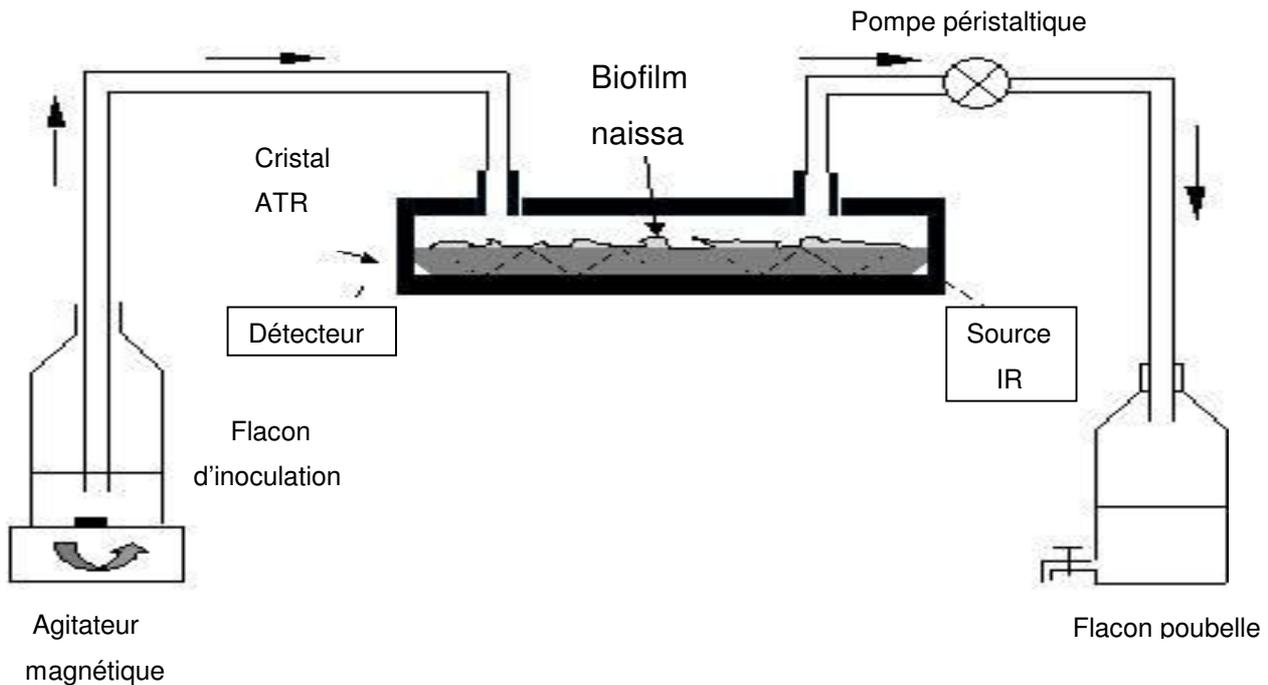


Schéma IV- 1 : Montage expérimental utilisé pour le suivi par IR en mode ATR de l'adhésion de *P. fluorescens*

Dans l'étude qui suit nous avons imposé les conditions expérimentales suivantes : durant la totalité des expériences, la température de la pièce, plongée dans l'obscurité, est maintenue à 21 ± 1 °C. Le pH des solutions et suspensions inoculées varie entre 6,8 et 7. La force ionique du milieu d'inoculation des bactéries est d'environ $3,4 \times 10^{-3}$ M.

IV - I.2.Exemple d'une cinétique d'adhésion bactérienne

Nous avons suivi, durant trois heures, l'évolution spectrale IRTF-ATR des 'composés' adhérant à la surface du germanium lorsqu'une suspension bactérienne de *P. fluorescens* est inoculée dans le montage décrit au paragraphe précédent. En comparant la signature spectrale observée sur la Figure IV- 1 aux empreintes de *P. fluorescens* aux différentes phases de croissance (c.f. chapitre III), on peut affirmer qu'il s'agit bien des bactéries qui adhèrent à la surface du cristal. De plus, en fonction du temps d'inoculation, les intensités de toutes les bandes augmentent ce qui implique une colonisation latérale du cristal par les bactéries.

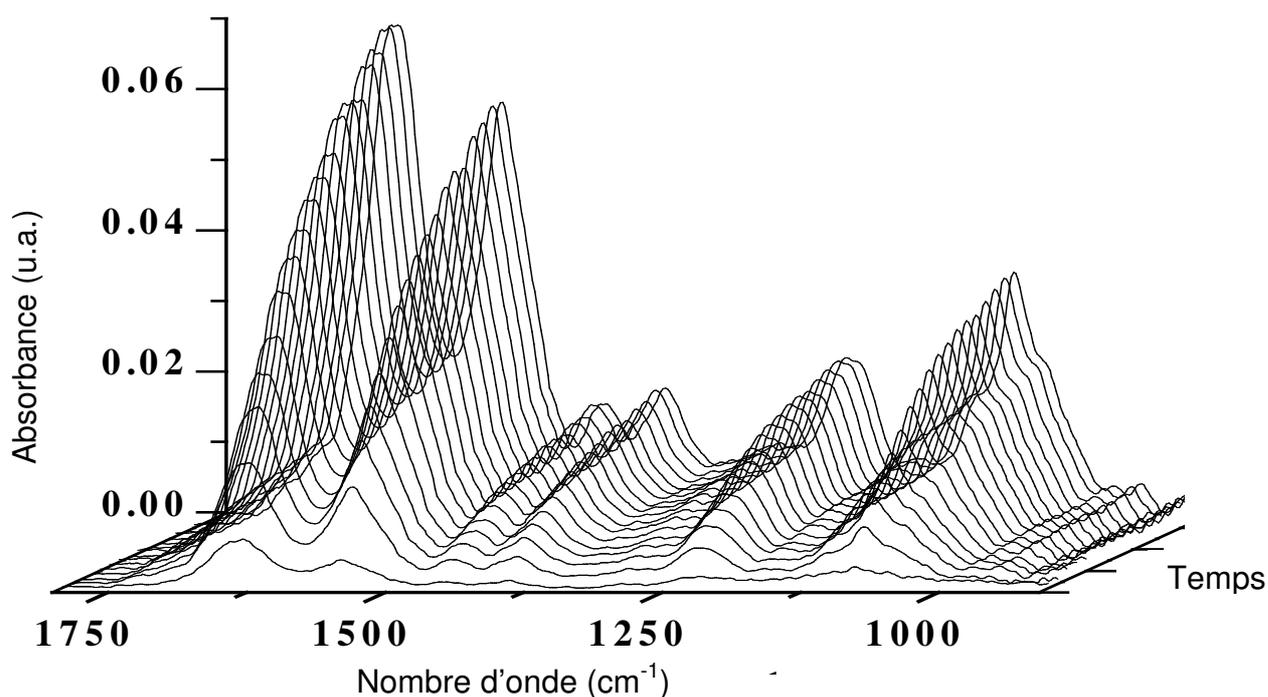


Figure IV- 1 : Evolution du spectre IR de *P. fluorescens* durant 3 h de passage de la suspension bactérienne à la surface d'un cristal de germanium.

IV - I.3. Spectre de *P. fluorescens* adhérees à la surface du cristal ATR de germanium

Les cellules bactériennes inoculées dans le montage expérimental étant prélevées en fin de phase exponentielle de croissance, nous présentons sur la Figure IV- 2 les empreintes spectrales IR de *P. fluorescens* sous forme planctonique, en fin de phase exponentielle de croissance. La Figure IV- 2 compare leurs empreintes spectrales IR avec d'une part celles des bactéries en suspension après 3 h d'inoculation dans le LB 0,5 g/L et d'autre part, celles des bactéries adhérees (après 3 h de circulation de la suspension bactérienne à la surface du cristal).

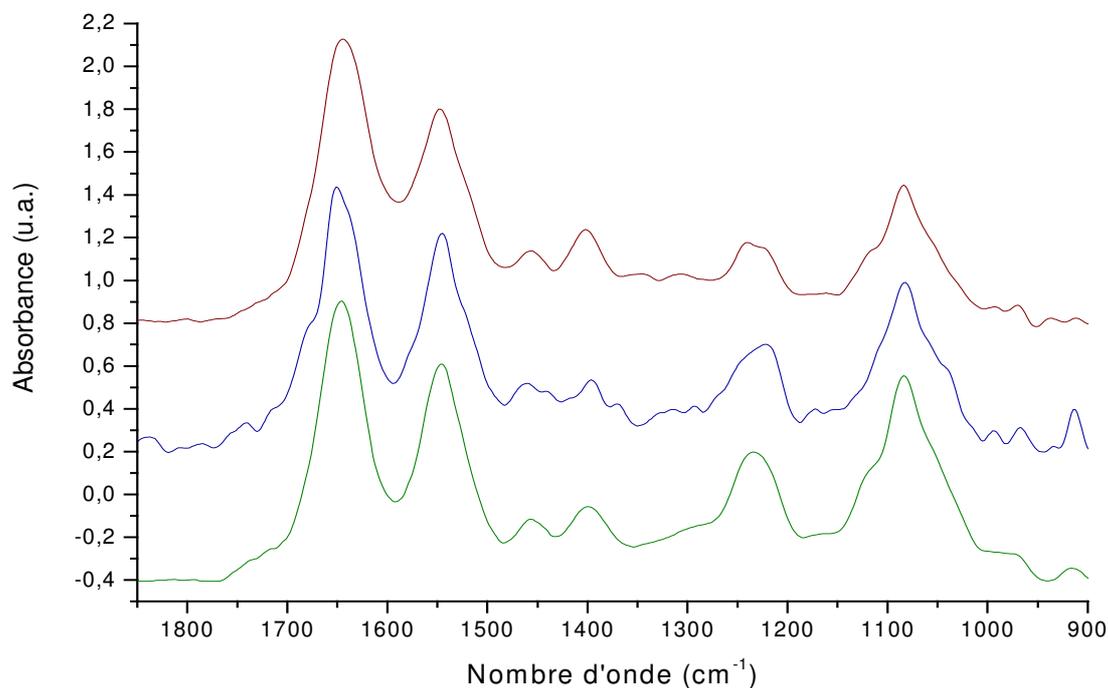
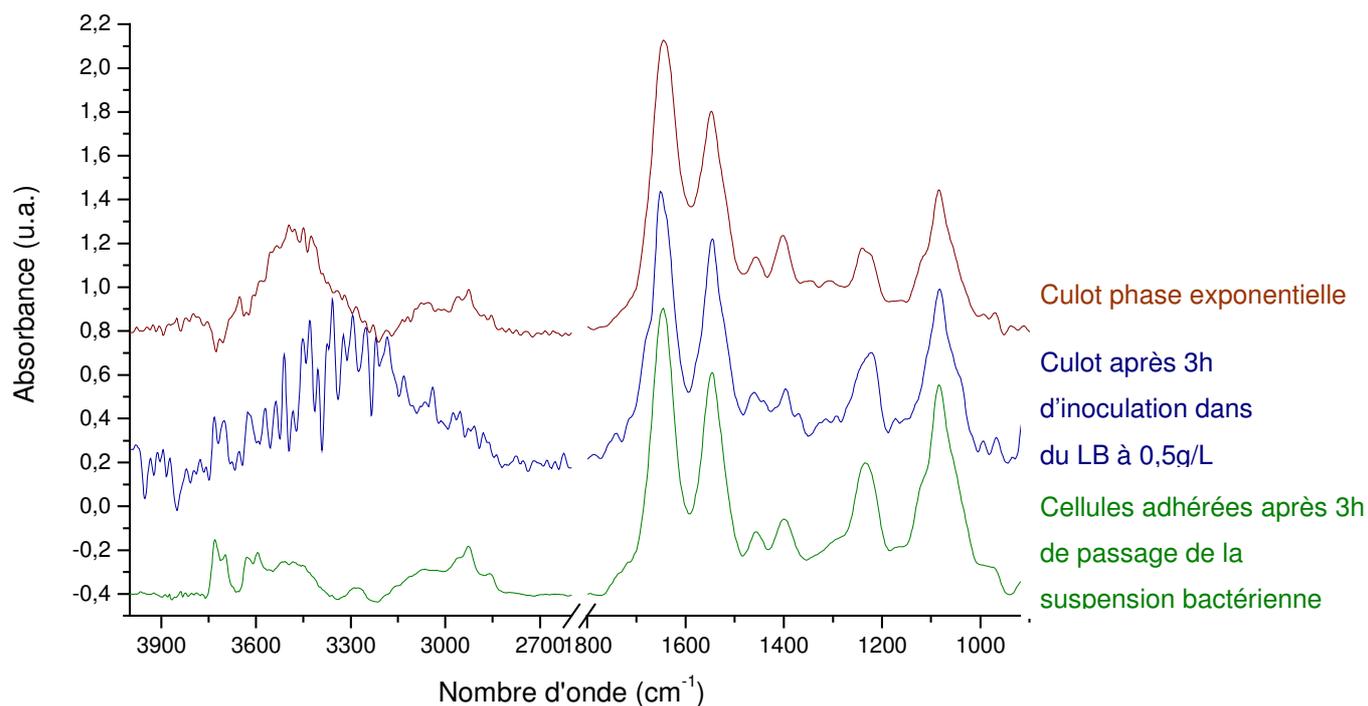


Figure IV- 2 : Spectres IR-ATR de deux culots de *P. fluorescens* respectivement en fin de phase exponentielle et après 3 h en suspension dans du LB à 0,5 g/L, comparés au spectre, obtenu *in situ*, de cellules adhérees au germanium après passage de 3 h de la suspension bactérienne à la surface du cristal. Les spectres ont été normés par rapport à la bande amide II centrée à 1548 cm⁻¹ après correction de leur ligne de base et soustraction de la vapeur d'eau résiduelle. Ils ont également été décalés pour plus de lisibilité. (haut) : vue générale, (bas) : agrandissement.

La comparaison de leur profil global met en évidence la présence des quatre principaux groupes de biomolécules retrouvées dans les composants bactériens : les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les polysaccharides. Les intensités relatives des bandes, leur position ainsi que leur profil diffèrent cependant sur l'intégralité du domaine spectral. Afin de faciliter l'interprétation des changements spectraux observés, nous commenterons progressivement les spectres, région par région.

IV - I.3.1.Région située entre 3600 et 3000 cm^{-1}

Cette région se caractérise par la présence de bandes larges attribuables aux groupements $-\text{OH}$ de l'eau ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$) et NH_2 présents dans l'adénine, la guanine, la cytosine et les protéines. Une bande centrée à 3290 cm^{-1} attribuable à $\nu\text{N-H}$ présente dans les protéines, ADN, ARN^{13,14} apparaît lors de l'adhésion des cellules. Elle ne présente pas de bandes distinctes si ce n'est sur le spectre des cellules adhérees vers 3285 cm^{-1} et 3400 cm^{-1} .

IV - I.3.2.Région située entre 3000 et 2800 cm^{-1}

L'analyse de la région entre 3000 et 2800 cm^{-1} apporte des informations concernant l'état (ordre/désordre) de la membrane cytoplasmique : les vibrations des groupes méthylènes apparaissant vers 2920 et 2850 cm^{-1} étant fréquemment utilisées pour sonder la fluidité des membranes biologiques¹⁵.

Le spectre représentatif des cellules en suspension dans le LB à 0,5 g/L est trop bruité pour apercevoir les bandes correspondant à ces absorptions et par conséquent, pour les comparer à celles des deux autres spectres. Le spectre des cellules adhérees présente les absorptions plus intenses à 2925 et 2855 cm^{-1} . De plus lorsque l'on compare les spectres des cellules en phase exponentielle à celles adhérees, le décalage en nombre d'onde de 2921 à 2925 cm^{-1} et de 2853 à 2855 cm^{-1} , indique un état plus désordonné de la membrane du second type de cellules.

IV - I.3.3.Région située entre 1750 et 1500 cm^{-1}

Deux absorptions sont visibles sur cette partie du spectre : il s'agit de la bande amide I

vers 1650 cm^{-1} et de la bande amide II vers 1548 cm^{-1} . Leurs intensités dominent les spectres des cellules en phase exponentielle et sont parmi les plus importantes sur les deux autres. Cependant, la contribution du peptidoglycane ainsi que des acides nucléiques sont également à prendre en compte, mais dans une moindre mesure¹⁶.

La position de la bande amide I donne une indication de la structure secondaire moyenne des protéines. La dérivée seconde (Figure IV- 3) révèle que trois bandes situées vers 1683 , 1651 et 1633 cm^{-1} constituent ce massif.

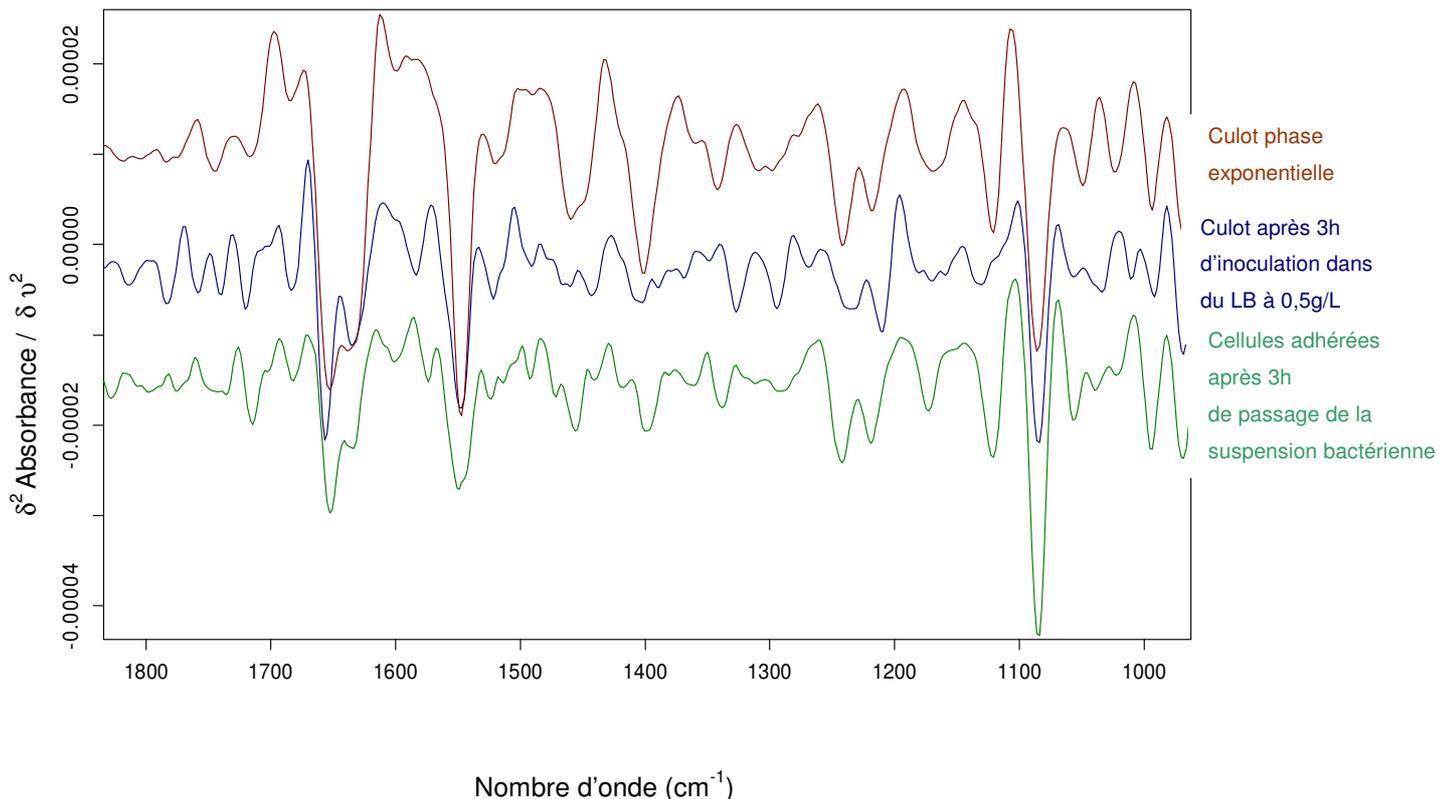


Figure IV- 3 : Dérivées secondes des trois spectres présentés Figure IV-2. La correspondance de chaque dérivée est indiquée à droite.

Elles traduisent la présence de structures en feuillets antiparallèles et en coudes (1683 cm^{-1}), en hélices α (1653 cm^{-1}) et en feuillets β (1635 cm^{-1}). Par ailleurs, un décalage en nombre d'onde est observable pour la bande centrée vers 1650 cm^{-1} : elle se déplace de 1651 à 1653 à 1655 cm^{-1} sur les spectres de *P. fluorescens* sessiles, puis sous forme planctonique en phase exponentielle et dans le LB à $0,5\text{ g/L}$. Cette évolution pourrait refléter selon Gué et *al.*¹⁵ une altération des protéines. Nous pouvons également remarquer que ces nombres d'ondes sont compris entre 1655 et 1650 cm^{-1} , ce qui d'après Chittur¹⁷ implique que l'on ait affaire à des protéines solubles, des bandes apparaissant entre 1658 et 1656 cm^{-1} correspondant aux protéines associées aux membranes.

Le profil de la bande amide II, centrée à 1548 cm^{-1} , diffère : un épaulement apparaît respectivement à 1583 cm^{-1} et à 1575 cm^{-1} sur les spectres des cellules en suspension dans le LB et sous forme sessile. La comparaison de ce spectre avec un spectre d'ARN, ADN bactérien¹⁶ suggère que cette bande pourrait résulter de la contribution d'acides nucléiques. Par ailleurs, Kalaji et Neal¹⁸ ont montré que la bande centrée à 1581 cm^{-1} pouvait être attribuée à $\nu_{\text{AS}}\text{COO}^-$ présent dans les exopolymères de capsule de *Pseudomonas* sp.NCIMB 2021. Notons que ces explications sont tout à fait hypothétiques : sans avoir extrait et analysé les composants de la bactérie sur laquelle nous travaillons, il est délicat d'attribuer précisément les bandes IR.

IV - I.3.4.Région située entre 1500 et 1350 cm^{-1}

Cette région regroupe les contributions des lipides ($1455, 1390\text{ cm}^{-1}$), du peptidoglycane ($1455, 1400, 1378\text{ cm}^{-1}$), des phospholipides ($1469, 1378\text{ cm}^{-1}$), des LPS ($1418, 1378\text{ cm}^{-1}$) et des acides nucléiques (1418 cm^{-1}). Le massif centré à 1455 cm^{-1} sur le spectre des cellules en suspension dans le LB $0,5\text{ g/L}$ semble moins intense par rapport à celui des autres spectres, ce qui est en accord avec la faible intensité des bandes situées entre 3000 et 2800 cm^{-1} .

IV - I.3.5.Région située entre 1350 et 1200 cm^{-1}

Deux éléments semblent contribuer à l'absorption observée : les acides nucléiques et les phospholipides (vers 1242 cm^{-1}). L'épaulement observable à 1218 cm^{-1} semble être dû à l'hydratation de l'ADN et de l'ARN (c.f. Chapitre III). Les bandes comprises entre 1300 et 1200 cm^{-1} sont très intenses, par rapport aux bandes amides, dans le cas des cellules sessiles, puis leur intensité diminue lorsque l'on passe des bactéries en suspension dans le LB à $0,5\text{ g/L}$ à la phase exponentielle.

Lorsque les cellules ont été inoculées dans le LB $0,5\text{ g/L}$, une évolution est perceptible entre 1350 et 1250 cm^{-1} .

IV - I.3.6.Région située entre 1200 et 900 cm^{-1}

Les changements spectraux observés dans cette région reflètent les altérations qui peuvent intervenir au niveau des membranes cellulaires, de l'ARN/ADN et des EPS. Le

massif situé entre 1150 et 1000 cm^{-1} regroupe les contributions des acides nucléiques (1085 cm^{-1}), des polysaccharides et LPS (1121, 1056 cm^{-1}), des phospholipides (1121, 1085 cm^{-1}), et du peptidoglycane (1200 à 980 cm^{-1}). Seules les protéines sont absentes de cette région.

L'intensité de la bande centrée à 1085 cm^{-1} domine le massif et correspond à $\nu_{\text{AS}}\text{PO}_2^-$. Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, les bandes à 1085 cm^{-1} et 1218 cm^{-1} sont corrélées. Ceci se vérifie sur les spectres présentés : plus la bande à 1218 cm^{-1} croît et plus celle à 1085 cm^{-1} croît. Leurs intensités sont maximales dans le cas de bactéries sessiles, et en suspension dans le LB à 0,5 g/L. Dans le cas des cellules adhérees, ce massif pourrait refléter certes la synthèse d'ARN/ADN mais également et surtout celle d'EPS et de slime. Ce slime semble absent des deux autres spectres en raison de la centrifugation des cellules.

IV - I.3.7. Conclusion

Les différences spectrales observées entre le spectre des bactéries adhérees et des mêmes bactéries en suspension, montrent que l'adaptation au mode de vie sessile nécessite des modifications physiologiques et phénotypiques^{19,20} qui permettent aux bactéries de se développer. L'augmentation de l'intensité relative des bandes centrées à 1085 cm^{-1} et à 1218 cm^{-1} enregistrées pour des cellules de *P. fluorescens* ayant adhéré après 3 heures de passage de la suspension bactérienne, confirme dans notre cas, la synthèse de slime et, dans une moindre mesure, d'ADN/ARN.

Dans la suite de notre étude, nous calculerons l'aire de la bande amide II, généralement utilisée comme biomarqueur^{12,21,22} et nous tenterons de relier le nombre de cellules viables et cultivables adhérees et l'aire de cette bande. Une telle corrélation nous permettrait grâce à une simple mesure IR de connaître le nombre d'UFC adhéree à une surface de manière *in situ*.

IV - I.4. Corrélation Aire de la bande Amide II – Nombre d'UFC

L'observation au microscope optique de cellules de *P. fluorescens* adhérees montre qu'elles se répartissent essentiellement sous forme d'une monocouche, même si à quelques endroits, des amas sont visibles (Figure IV- 4).

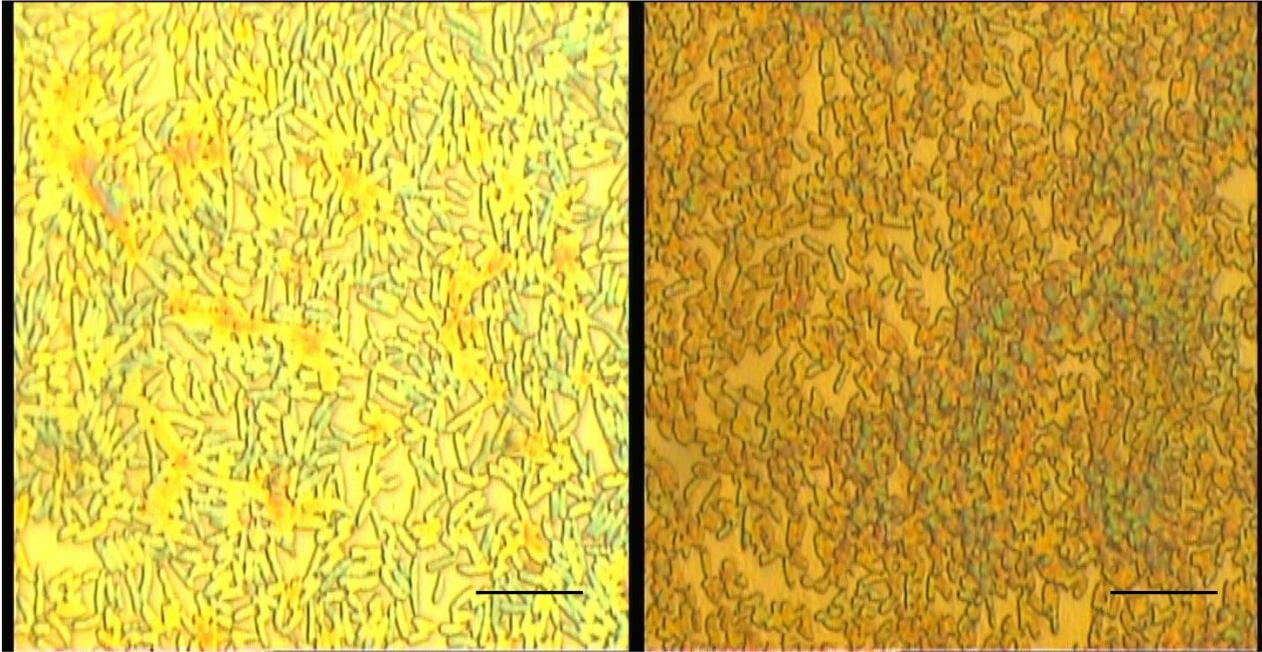


Figure IV- 4 : Photographies au microscope optique de cellules de *P. fluorescens* adhérees après 2 h 40 (à gauche) et 5 h 10 (à droite), de circulation de la suspension bactérienne à la surface du germanium. Le grossissement x100 a été utilisé et les cellules sont observées sans marquage. L'échelle représente 10 μm .

Les bactéries sont plus allongées après 2 h 40 d'adhésion que celles ayant adhéré durant 5 h 10. Cette diminution de taille peut faire suite à l'état de stress dans lequel se trouve les bactéries après leur passage d'un milieu riche (LB 25 g/L) dans un milieu plus pauvre (LB 0,5 g/L).

Afin d'établir une corrélation entre le nombre d'unités formant colonies (UFC) adhérees et l'aire de la bande amide II, nous avons extrait le cristal de la cellule à circulation, à la fin de chaque expérience IR-ATR. Après l'avoir rincé à l'eau apyrogène stérile afin d'enlever les cellules peu adhérees, une partie a été récupérée à l'aide d'écouvillons stériles. L'échantillon fut ensuite remis en suspension et dilué avant d'être étalé sur une boîte de Pétri (le protocole opératoire est décrit en détails au chapitre II).

L'évolution de l'aire de la bande amide II en fonction du nombre d'UFC adhérees à la surface du germanium est reportée sur la Figure IV- 5.

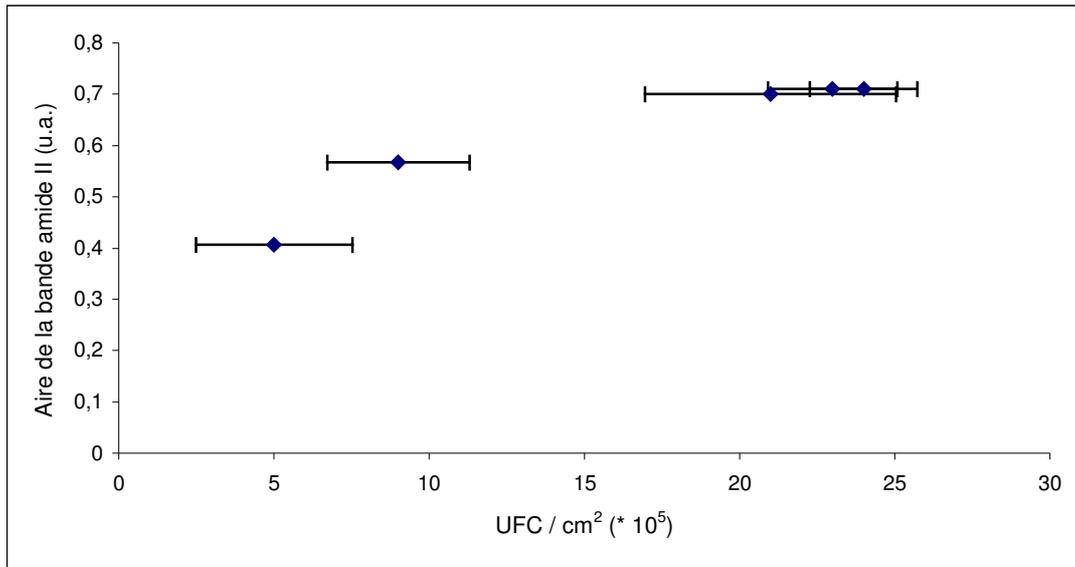


Figure IV- 5 : Evolution de l'aire de la bande amide II en fonction du nombre d'UFC /cm² adhérentes à la surface du cristal de germanium, au bout de cinq temps différents de circulation de la suspension bactérienne à la surface du germanium : t = 2 h 25, 2 h 40, 3 h, 5 h, 5 h 20.

Deux groupes de valeurs d'UFC / cm² sont obtenues :

- le premier tel que le nombre d'UFC / cm² est inférieur à 15*10⁵ : l'aire de la bande amide II augmente avec le nombre de cellules du biofilm qui interagissent avec l'onde évanescente. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux réalisés par Nivens et *al.*¹² qui montrent une corrélation entre l'aire IR de la bande amide II et le nombre d'UFC présentes par cm² à la surface du matériau colonisé.

- Le second situé entre 15*10⁵ et 30*10⁵ UFC / cm² : l'aire de la bande amide II atteint un plateau alors que le nombre d'UFC / cm² augmente. Ceci suggère que des bactéries, ou des portions de bactéries, ne sont plus détectées. Après 3 heures de circulation de la suspension bactérienne à la surface du germanium, le biofilm peut être composé de plusieurs couches, ou du moins d'amas cellulaires, comme on peut le voir sur la Figure IV-5. On peut également supposer qu'après 3h d'adhésion à la surface du germanium l'état physiologique des cellules s'est altéré ce qui pourrait engendrer une diminution de leur taille (c.f. Figure IV-5) même si globalement leur nombre augmente.

Le taux de recouvrement du germanium par les bactéries (Figure IV- 4) au bout de trois heures, est approximativement 65 % ± 15 % (calcul effectué par analyse d'images).

Evaluons, à présent, la surface recouverte par les UFC.

En considérant que :

- la surface de *P. fluorescens* CIP 69.13, dans nos conditions de culture, est d'environ de $1 \mu\text{m}^2$

- toutes les cellules adhérees au cristal soient viables et cultivables

on devrait relever environ $6,7 * 10^7$ UFC / cm^2 .

Or, nous en obtenons environ $2 * 10^6$ par cm^2 . Elles ne représentent donc que 2 à 2,5 % du nombre de cellules totales adhérees.

Ce résultat est faible sans toutefois être disproportionné car les cellules prélevées sont d'une part remises en culture dans un milieu plus pauvre (R2A) et d'autre part, doivent se réadapter à la nouvelle 'surface' que constitue la gélose. L'âge des cellules est également un facteur à prendre en considération : au fur et à mesure du temps d'inoculation dans le LB 0,5 g/L, leur cultivabilité diminue. Ceci pourrait expliquer la relation quasi linéaire obtenue entre l'aire de la bande amide II et le nombre d'UFC durant les trois premières heures de passage de la suspension bactérienne à la surface du cristal ATR.

IV - II. Nature du film primaire obtenu à la surface du germanium par passage d'une solution stérile de LB

Lorsqu'une surface est en contact avec une suspension bactérienne, il se produit, dès les premières minutes d'exposition, l'adsorption de macromolécules organiques et / ou de particules inorganiques présentes dans le milieu ou sécrétées par les microorganismes (c.f. Chapitre I). Cette phase initiale est déterminante car elle représente généralement l'étape préalable à l'adhésion bactérienne.

IV - II.1. Caractérisation des composés du milieu nutritif LB s'adsorbant à la surface des cristaux ATR de germanium

La suspension d'inoculation étant composée de LB à 0,5 g/L, notre objectif est de connaître l'influence du film conditionnant établi à la surface du germanium par ce milieu de culture.

Revoyons dans un premier temps la composition chimique du milieu nutritif LB.

Le milieu Luria-Bertani (LB) contient²³ :

- 10 g/L de peptone tryptique de caséine soit 80 % acides aminés, 7 % de carbohydrates, 6% composés inorganiques et 7% de cendres (pourcentages sur la masse sèche)
- 5 g/L d'extraits de levure qui proviennent de l'inactivation de cellules de levure. Ils sont constitués essentiellement d'acides aminés et de polypeptides
- 10 g/L de NaCl

Comparons les spectres IR correspondant respectivement au milieu nutritif LB en mode transmission et des molécules présentes dans le milieu LB et qui s'adsorbent à la surface du cristal (Figure IV- 6).

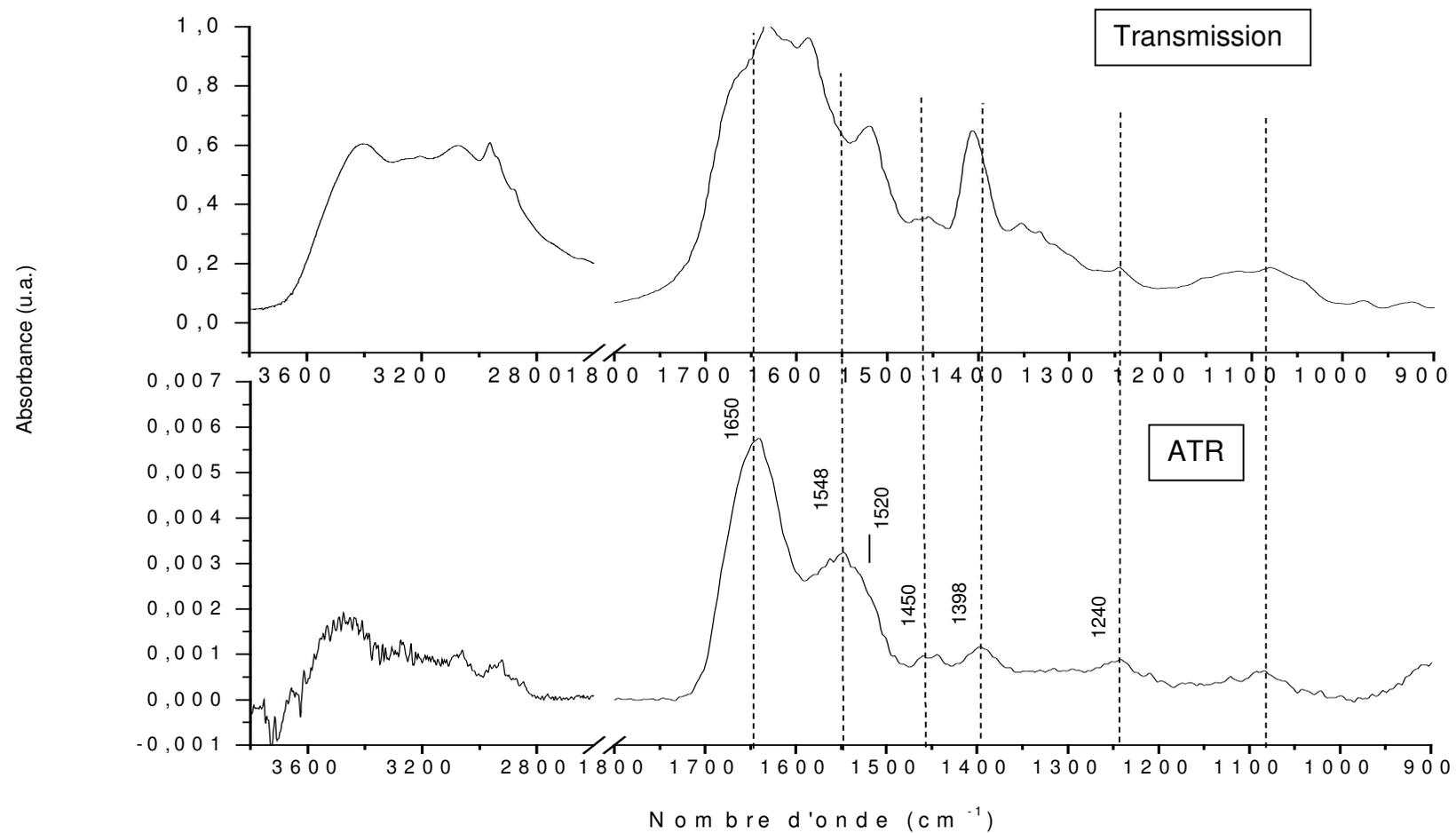


Figure IV- 6 : Spectres IR du milieu LB en poudre enregistré en transmission (haut). Spectre des composés présents dans le LB adsorbés à la surface d'un cristal ATR de germanium après 24h de circulation du bouillon stérile à 0,5 g/L.

Le spectre ATR des composés adsorbés à la surface du cristal est très différent de celui du milieu LB enregistré en transmission.

Le spectre du milieu LB (transmission) est dominé par le massif situé entre 1700 et 1500 cm^{-1} regroupant les contributions des protéines et des acides aminés²⁴. Si l'on observe attentivement ce spectre, on peut également noter la présence d'une bande intense centrée à 1400 cm^{-1} , attribuable à $\nu_{\text{S}}\text{COO}^-$ et caractéristique des acides aminés. Cette bande étant absente d'un spectre de protéine, ceci confirme la prépondérance des acides aminés.

Après 24 h de circulation du milieu nutritif LB, stérile, à la surface du germanium, deux bandes d'absorption dominant le spectre enregistré en mode ATR et sont centrées à 1650 cm^{-1} (amide I) et 1548 cm^{-1} (amide II). On note également la présence de la bande amide III à 1240 cm^{-1} . Ce spectre est tout à fait comparable à celui d'un spectre de protéines²⁵ ce qui suggère que des protéines s'adsorbent à la surface du germanium. De nombreuses études font mention de cela. On peut notamment citer les travaux de Baier en 1972, qui fut le premier à indiquer qu'un cristal de germanium exposé pendant dix minutes à de l'eau de mer se recouvre d'un film conditionnant de protéines²⁶. Les acides aminés présents en grande quantité (80 %) dans le LB, et qui dominant le spectre en transmission, sont absents du spectre ATR et restent par conséquent en solution.

IV - II.2. Cinétique d'adsorption des composés du milieu LB à la surface du germanium

L'intensité de la bande amide II, centrée à 1548 cm^{-1} , caractérisant les protéines contenues dans le LB, et s'adsorbant à la surface du cristal est portée en fonction du temps de circulation de ce milieu 0,5 g/L (Figure IV- 7).

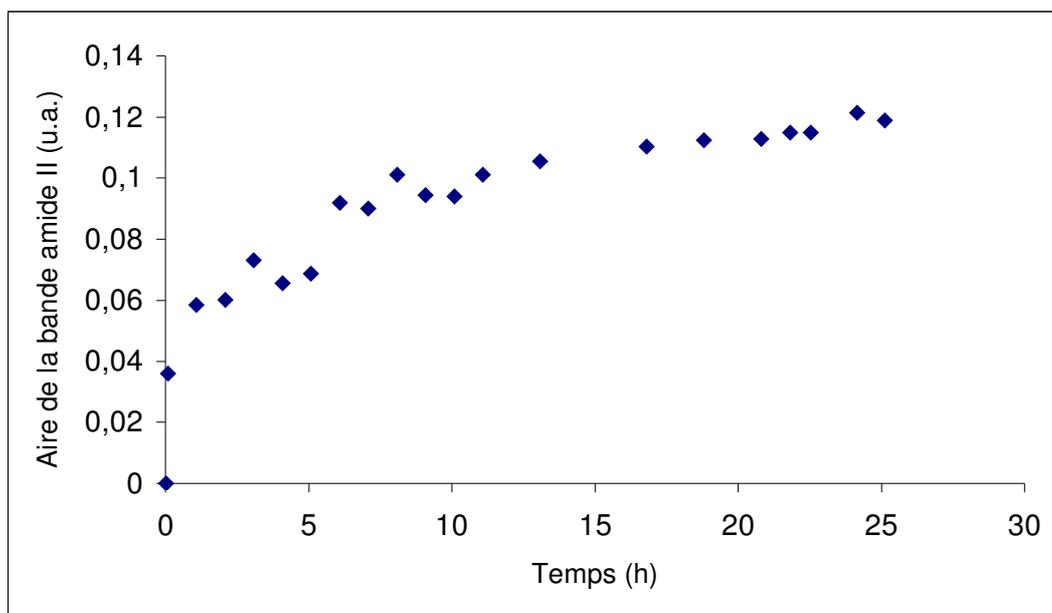


Figure IV- 7 : Cinétique d'adsorption des protéines présentes dans le bouillon stérile LB à 0,5 g/L, à la surface d'un cristal ATR de germanium.

La quantité de macromolécules adsorbées après exposition du germanium à un flux de milieu nutritif stérile, pendant 24 heures, tend à se stabiliser dès 12 heures. De plus, au bout de 1 h 30, l'aire de la bande amide II est égale à la moitié de son aire maximale atteinte, ce qui suggère une adsorption rapide des protéines, présentes dans le LB, à la surface du germanium.

IV - III. Adhésion de *P. fluorescens* à la surface du cristal

Dans les paragraphes qui suivent, nous étudierons l'adhésion de *P. fluorescens* à la surface d'un cristal de germanium en fonction : de la présence ou non d'un film conditionnant formé, comme ci-dessus, à partir d'une solution stérile de milieu LB, de la concentration en milieu LB de la suspension d'inoculation, de la quantité de bactéries inoculées et de la durée d'inoculation.

IV - III.1. Influence de la présence d'un film primaire à la surface du germanium sur l'adhésion bactérienne

La cellule à circulation, contenant le germanium, préalablement recouvert ou non d'un film conditionnant, a été inoculée durant 3 h à l'aide d'une suspension contenant des bactéries en fin de phase exponentielle ($\sim 10^8$ UFC / mL) dans un milieu LB stérile à 0,5 g/L.

Les évolutions des aires des bandes amide II et PS ont été suivies par spectroscopie IR en mode ATR et sont représentées sur la Figure IV- 8.

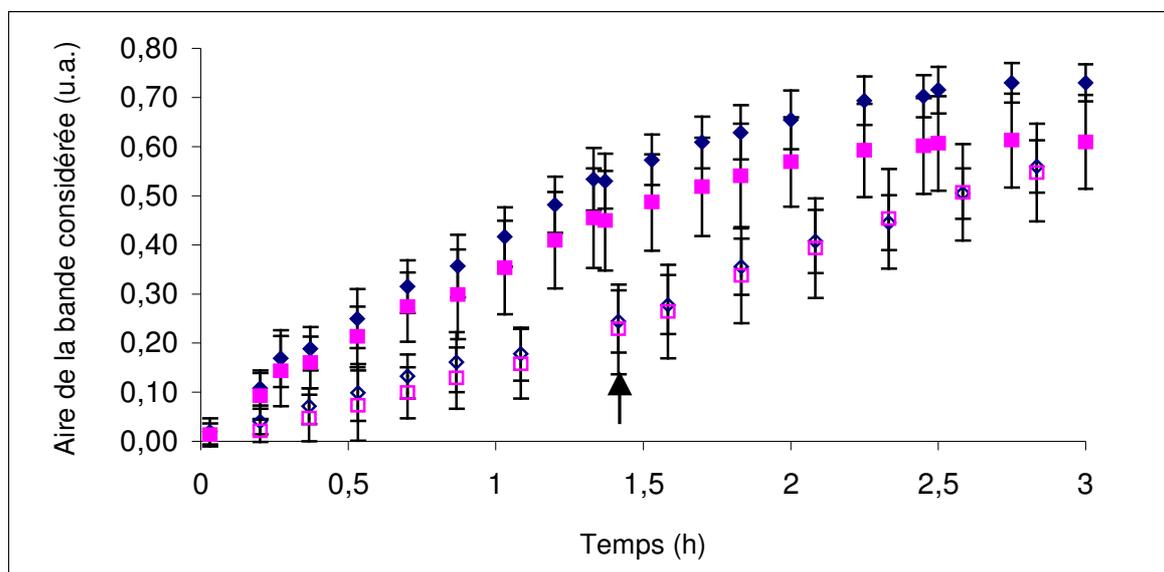


Figure IV- 8 : Evolution des bandes amide II, centrée à 1548 cm^{-1} (losanges) et PS, centrée à 1085 cm^{-1} (carrés) en fonction du temps d'inoculation de la suspension bactérienne de *P. fluorescens* à la surface d'un cristal ATR de germanium recouvert (symboles pleins) ou non (symboles vides) d'un film conditionnant (FC) préalable. Le FC a été obtenu par passage d'un bouillon LB stérile à $0,5\text{ g/L}$, sur le cristal, pendant 24h. Les deux types d'expérience ont été répétées trois fois, à partir de trois inocula différents. La flèche indique un point d'inflexion apparaissant un peu avant 1 h 30 de circulation.

Les cinétiques présentées diffèrent selon l'existence ou non d'un film conditionnant à la surface du cristal.

Lorsque le cristal est pré-conditionné, l'adhésion bactérienne suit une exponentielle du type : $A = A_{\text{max}} (1 - e^{-kt})$ (c.f. chapitre V) tandis qu'en l'absence d'un film primaire préétabli, deux étapes peuvent se distinguer : la première allant de 0 à 1,5 h et la seconde de 1,5 à 3 h. La cinétique d'adhésion de *P. fluorescens* s'accélère après 1 h 30 de passage de la suspension, ce qui correspond au temps nécessaire à la sorption de la moitié des protéines venant du LB, à la surface du germanium (c.f. Figure IV- 7).

Par ailleurs, l'examen de la Figure IV- 8 montre qu'après 3h de circulation, l'aire des bandes amide II, relevée pour chaque manipulation, est proche (0,6 u.a. sans FC et 0,7 u.a. avec FC). Nous pouvons donc supposer que lorsque le cristal est exempt de film primaire, celui-ci se forme durant les premières 90 minutes ce qui facilite, par la suite, l'adhésion de *P. fluorescens*. Il y aurait, dans un premier temps, une adsorption de LB sur la surface du cristal en même temps que l'adhésion bactérienne. Puis, dans un

second temps, l'adhésion bactérienne prévaudrait.

Il faut également souligner que même si le milieu d'inoculation des bactéries est du LB à 0,5 g/L, celui-ci ne contribue que très faiblement, à hauteur de 0,3 % (résultats non montrés), à l'aire de la bande amide II représentative du biofilm.

Le pré-conditionnement de la surface par des protéines favorise l'adhésion de *P. fluorescens*. Rubio et al.²⁷ ont observé un résultat similaire concernant *P. fragilis* : la proportion de bactéries viables augmente en présence d'un film conditionnant protéique de BSA (bovin serum albumin). Ceci pouvant s'expliquer par le fait que la présence de protéines à la surface du matériau à coloniser réduit le stress bactérien. Les travaux réalisés par Samuelsson et Kirchman¹⁰ ont également montré que les protéines adsorbées permettent aux bactéries de se développer pour former un biofilm, le film conditionnant servant de nourriture²⁸.

IV - III.2. Adhésion de *P. fluorescens* en fonction de la concentration en LB

Dans ce paragraphe, nous allons discuter l'effet de la concentration en LB sur l'inoculation, et plus particulièrement l'adhésion de *P. fluorescens* au germanium. Trois concentrations ont été testées : 5 g/L, 0,5 g/L et 0,05 g/L. L'évolution de l'aire de la bande amide II en fonction de la concentration en LB est représentée sur la Figure IV- 9 durant deux heures de circulation de la suspension bactérienne à la surface du germanium.

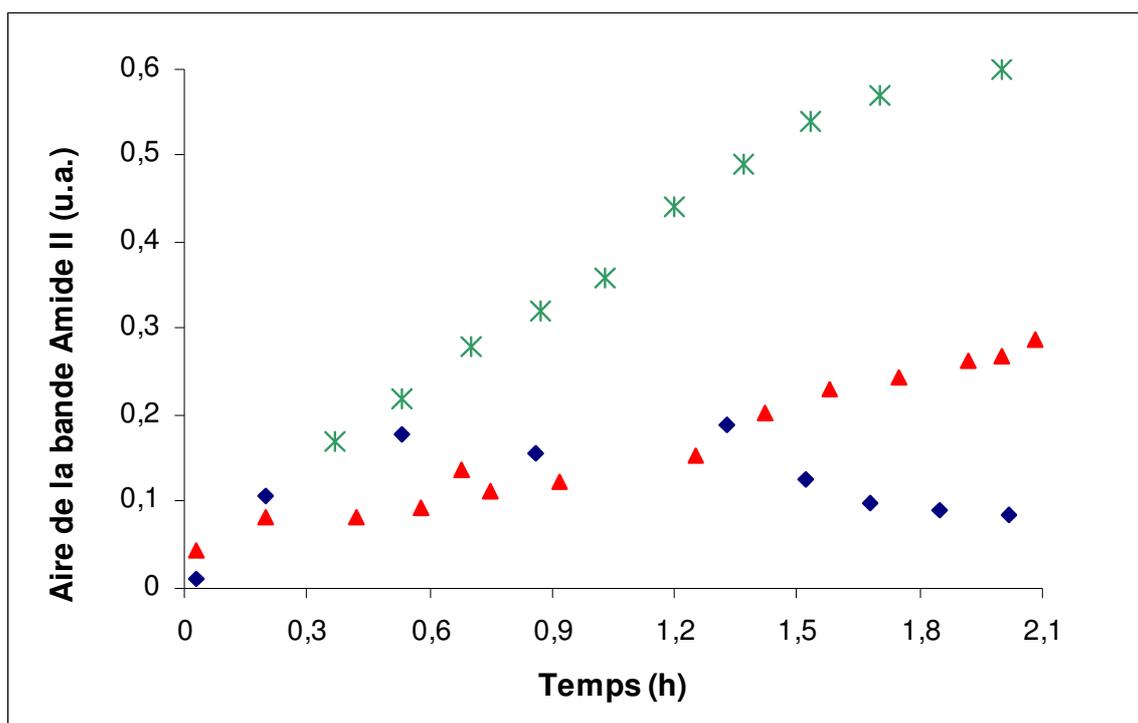


Figure IV- 9 : Evolution de l'aire de la bande amide II lors de l'adhésion de *P. fluorescens* à la surface d'un cristal ATR de germanium. Les bactéries ont été inoculées dans du bouillon LB concentré à 5 g/L (triangles), 0,5 g/L (étoiles) et 0,05 g/L (losanges). Pour chaque expérience, le cristal de germanium a été pré-conditionné par passage de solutions de LB stériles respectivement à 5, 0,5 et 0,05 g/L.

Deux évolutions se manifestent : la première se situe entre 0 et 40 minutes et la seconde entre 40 minutes et 2 heures. Durant les 40 premières minutes, l'aire de la bande amide II augmente, quelle que soit la concentration testée. Elle décline ensuite, lorsque les bactéries sont inoculées dans du LB à 0,05 g/L ou continue à augmenter dans le cas des deux autres concentrations. Cependant, la croissance de la bande amide II est deux fois plus importante dans le cas de la concentration en LB à 0,5 g/L. L'évolution de l'aire de la bande PS (non montrée) en fonction du temps d'inoculation indique une diminution marquée des PS, à partir de 40 minutes, dans le cas de la concentration en LB à 0,05 g/L. D'après ces résultats, on pourrait penser que lorsque les bactéries sont inoculées dans du LB à 0,05 g/L, elles subissent un stress trop important qui les empêche de se développer. Ce stress pourrait également engendrer une diminution de leur taille. Dans ce cas, même si globalement autant de bactéries adhèrent, elles sont plus petites, et recouvrent donc une surface moins importante. James et *al.*²⁹ ont montré qu'une réduction de la taille des bactéries peut survenir suite à une carence nutritive.

La différence de cinétique observée dans le cas des deux autres concentrations est plus difficile à expliquer et nous n'avons pas de réponse satisfaisante à apporter.

Au terme de cette expérience, les évolutions présentées nous ont amené à choisir le LB concentré à 0,5 g/L pour inoculer *P. fluorescens* dans la cellule à circulation.

Testons, à présent l'influence de la concentration initiale en bactéries inoculées.

IV - III.3. Influence de la concentration initiale bactérienne inoculée

Les spectres de biofilms de *P. fluorescens* ont été enregistrés en faisant varier la concentration en bactéries inoculées de $4,1 \times 10^7$ UFC / mL à $5,6 \times 10^8$ UFC / mL.

L'évolution de l'aire de la bande amide II est reportée sur la Figure IV- 10, en fonction du temps.

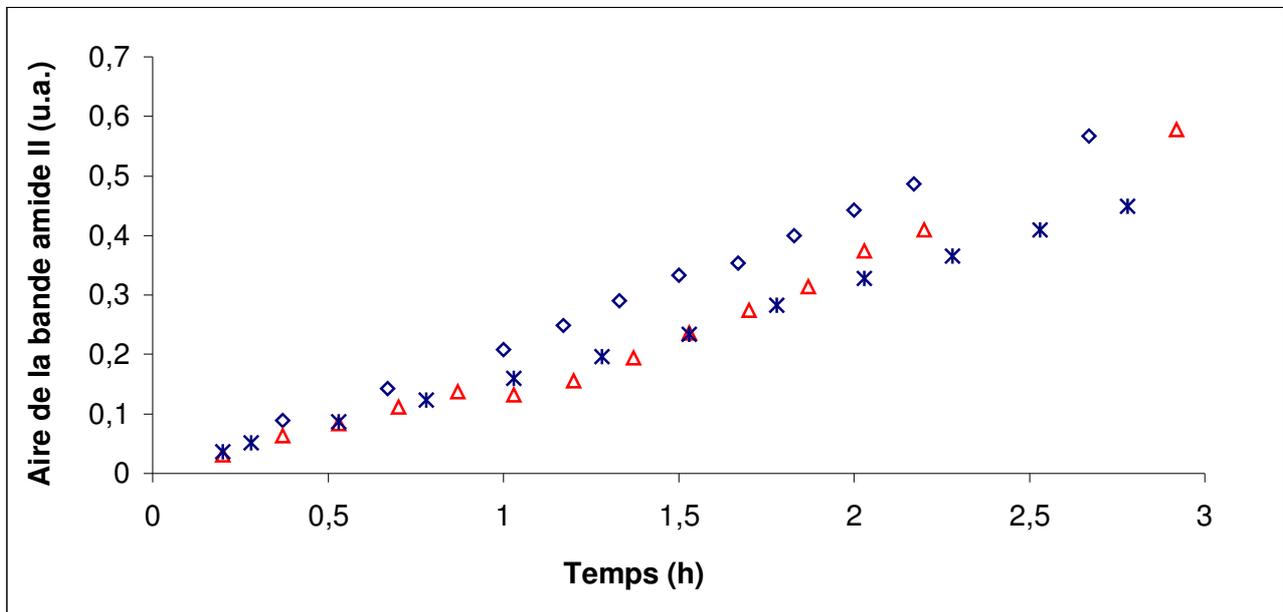


Figure IV- 10 : Cinétiques d'adhésion de *P. fluorescens* en fonction de la concentration initiale en bactéries. Trois concentrations bactériennes sont représentées : triangles rouge ($DO_i = 0,32$ équivalant à $5,6 \times 10^8$ UFC/mL) ; losange bleu ($DO_i = 0,28$ équivalant à environ 10^8 UFC / mL) ; étoiles bleue ($DO_i = 0,17$ équivalant à $4,1 \times 10^7$ UFC / mL). Il n'y a pas de film conditionnant de LB préétabli à la surface des cristaux, avant le passage de la suspension.

Les cinétiques obtenues montrent que quelle que soit la concentration bactérienne de départ :

- toutes conduisent à la formation d'un biofilm sur le germanium
- l'aire de la bande amide II est équivalente (aux incertitudes près)
- toutes évoluent de la même façon : une cassure est observable au bout de 1 h 30

Par conséquent, cette étude montre que, dans le domaine de concentrations étudié, celle-ci influence peu la formation du biofilm de *P. fluorescens* sur le germanium.

Le même type d'évolution se manifeste lorsque le cristal de germanium a été pré-conditionné à partir d'une solution stérile de LB (résultats non montrés).

La densité optique 0,28 à 620 nm correspondant à environ 10^8 UFC / mL a été retenue pour la formation du biofilm de référence.

IV - III.4. Influence du temps d'inoculation

Après avoir testé l'influence de la concentration bactérienne initiale inoculée ainsi que la concentration en LB de la suspension d'inoculation, examinons le comportement du biofilm de *P. fluorescens* en fonction du temps.

La Figure IV- 11 présente l'évolution des intensités des bandes principales.

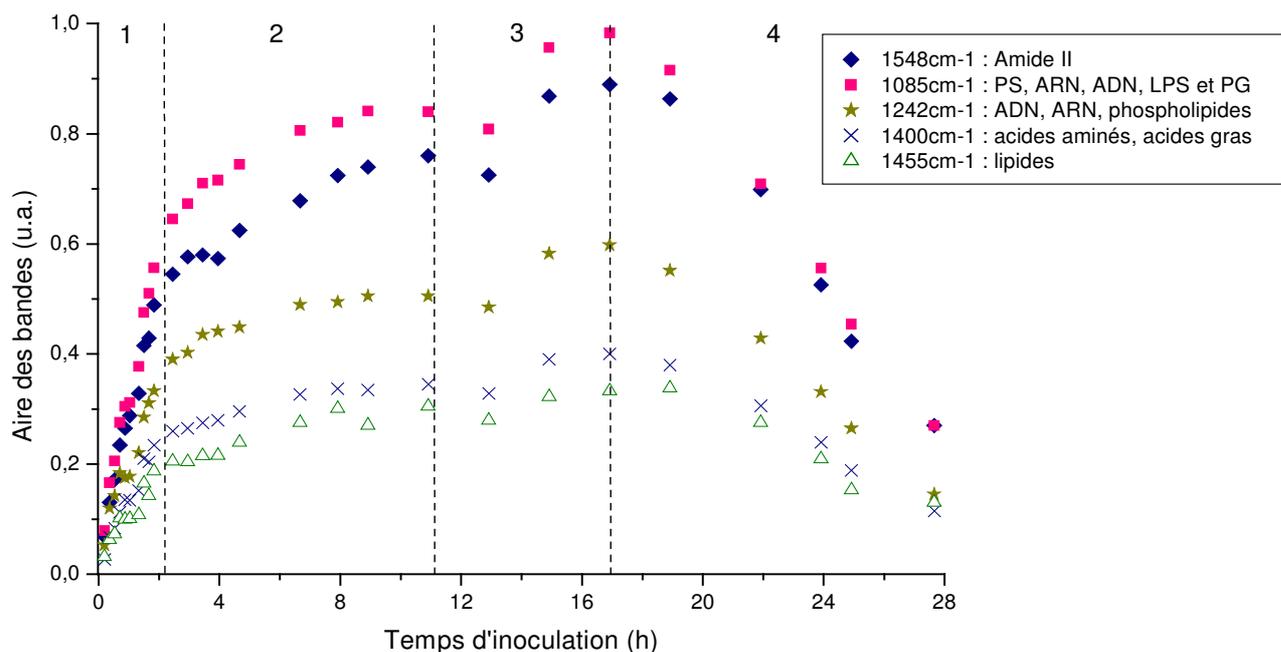


Figure IV- 11 : Evolution des aires des principales bandes IR indiquées sur les spectres précédents.

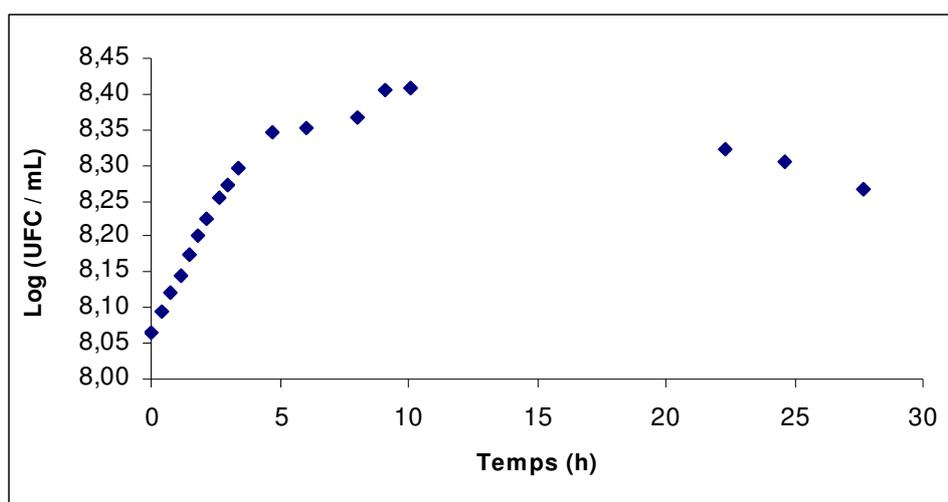


Figure IV- 12 : Evolution des UFC dans la suspension d'inoculation lors d'une manipulation de formation d'un biofilm de *P. fluorescens* à la surface d'un cristal ATR de germanium.

Comme ceci est illustré sur la Figure IV- 11, les aires de toutes les bandes augmentent en fonction du temps (jusqu'à 18 h).

Quatre étapes se distinguent lors du passage de la suspension bactérienne sur le germanium, durant 28 h. Une première allant de 0 à 2 h 30, une seconde allant de 2 h 30 à 11 h, une troisième allant de 11 h à 18 h et la dernière allant de 18 h à 28 h. L'augmentation des aires de toutes les bandes de 0 à 18 h reflète une accumulation de biomasse à la surface du germanium ainsi qu'une augmentation du recouvrement de la surface par les bactéries.

- Durant la première phase, on remarque que l'aire du massif centré à 1085 cm^{-1} devient supérieure à celle de l'amide II ce qui prouve que nous ne sommes pas en présence d'une simple adhésion. Les bactéries semblent s'adapter à leur nouvel état en synthétisant des EPS et de l'ARN. Cette tendance se confirme durant les deux périodes suivantes (phases 2 et 3)
- Les 'pseudo-paliers' s'établissant entre 2 h 30 et 11 h ainsi qu'entre 15 et 18 h, peuvent être liés à la formation de plusieurs couches bactériennes au niveau du cristal.
- La dernière phase indique, par la diminution des aires de toutes les bandes, un détachement du biofilm.

L'observation conjointe de la Figure IV- 12, montre que les UFC suivent la même tendance que les aires des bandes. L'augmentation de leur nombre durant les 10 premières heures d'inoculation implique que les cellules restent actives durant leur

inoculation dans le LB à 0,5 g/L. Leur nombre décline ensuite, tout comme l'aire des bandes : de moins en moins de bactéries adhèrent. Elles quittent la surface.

Sur la Figure IV- 13 sont superposés les spectres de *P. fluorescens* au bout de 1 h, 3 h, 18 h et 26 h de circulation de la suspension bactérienne.

Les spectres de *P. fluorescens* ont une allure quasi-identique ce qui laisse supposer qu'aucune modification physiologique majeure des bactéries n'a lieu. La seule différence notable concerne la région située entre 1200 et 1120 cm^{-1} : une bande située à 1175 cm^{-1} semblerait croître. Cependant, il convient d'être méfiant car, comme nous allons l'évoquer dans le paragraphe suivant, le joint Kalrez utilisé pour maintenir l'étanchéité de la cellule à circulation, présente des absorptions dans cette région.

La cinétique d'adhésion présentée Figure IV- 11 ainsi que l'observation des spectres ATR de cellules adhérentes au bout de 3h de circulation de la suspension bactérienne, permettent d'affirmer que 3h semble être une durée suffisante pour former notre biofilm naissant de référence. A cet instant, les spectres présentent un bon rapport signal/bruit tout en n'atteignant pas la saturation. Ce dernier point est essentiel pour pouvoir détecter dans de bonnes conditions les changements spectraux liés à l'évolution du biofilm naissant en réponse à des changements de conditions environnementales.

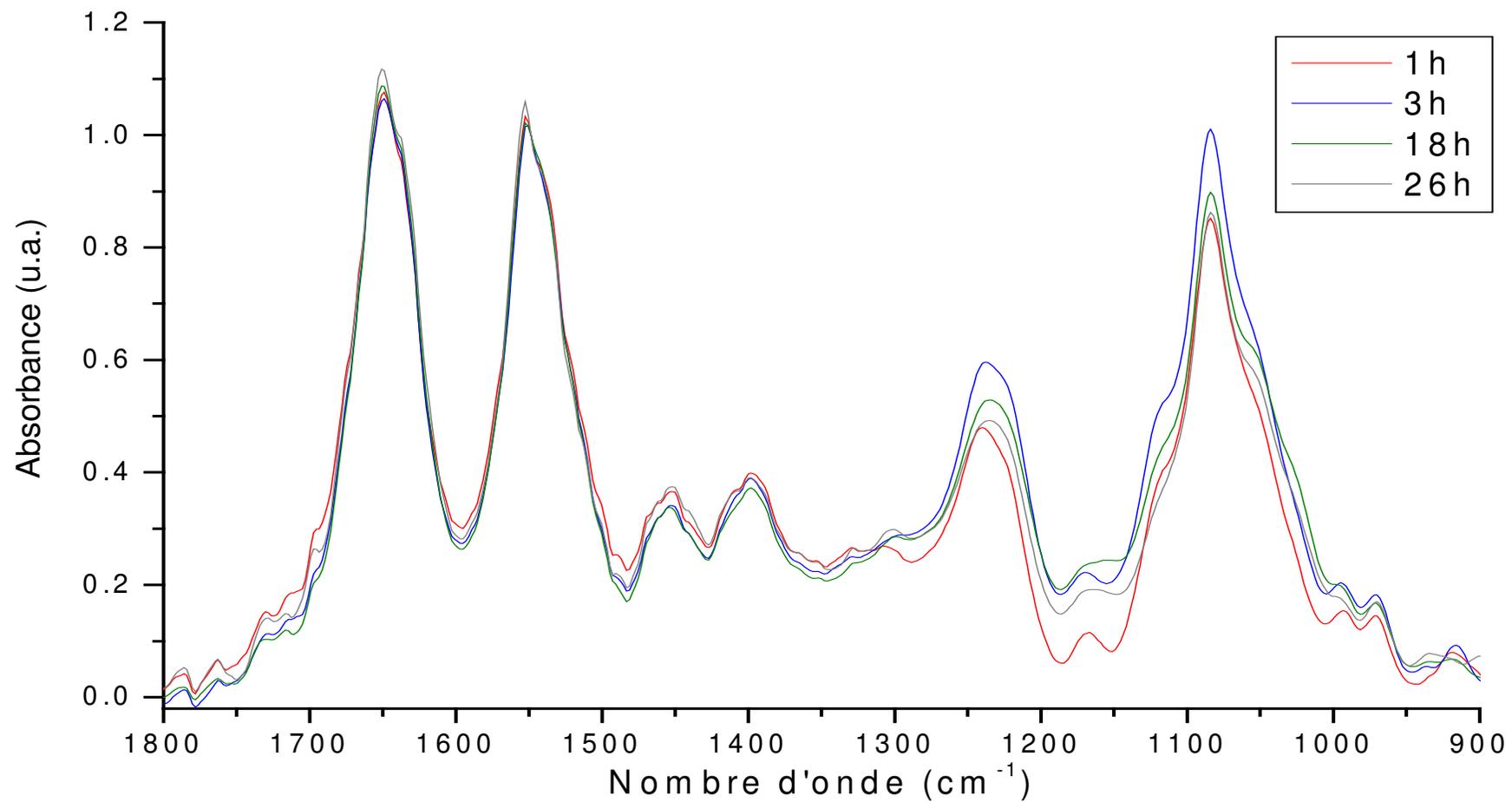


Figure IV- 13 : Evolution du profil spectral IR de *P. fluorescens* au cours de son adhésion sur cristal ATR de germanium au bout de 1 h, 3 h, 18 h et 26 h. Les spectres ont été normés par rapport à la bande amide II.

IV - IV. Biofilm de référence

L'objectif de ce sous-chapitre est de faire le point sur les différentes caractéristiques (morphologiques, structurales, chimiques) du biofilm de *P. fluorescens* qui servira de référence pour étudier la faisabilité du système proposé (chapitre V). Idéalement, nous recherchons un biofilm monocouche, monospèce qui soit capable de répondre le plus rapidement possible à tout changement de la qualité microbiologique de l'eau du réseau.

IV - IV.1.Synthèse des conditions expérimentales retenues pour la formation du biofilm modèle

Le milieu d'inoculation des bactéries est le LB à 0,5 g/L qui permet de garantir à *P. fluorescens* une quantité de nutriments nécessaires à son développement et d'éviter une trop grande interférence spectrale avec les spectres bactériens. Des cellules de *P. fluorescens* sont collectées en fin de phase exponentielle après une pré-culture puis une culture dans du milieu LB à 25 g/L. Elles sont ensuite centrifugées et seul le culot est récupéré et remis en suspension dans du bouillon LB à 0,5 g/L. La densité optique est ajustée à 0,28 à 620 nm, ce qui correspond à une concentration initiale en bactéries d'environ 10^8 UFC / mL. Chaque solution/suspension est mise en circulation sous un débit constant, égal à 0,7mL / min, pendant toute la durée des expériences.

En suivant ces conditions expérimentales, des variations peuvent, malgré tout, être observées notamment en ce qui concerne les temps de latence qui apparaissent durant la première heure d'inoculation de la suspension à la surface du cristal. Ces résultats rejoignent ceux de Walker et *al.*³ et Suci et *al.*³⁰ qui notèrent un changement de la cinétique d'adhésion bactérienne suite à des modifications de conditions de culture.

IV - IV.2.Aspect macroscopique

A la fin de manipulations de formation du biofilm de *P. fluorescens* sur germanium, la cellule ATR a été démontée, le cristal sorti avec précaution, puis rincé à l'eau apyrogène stérile afin d'enlever les cellules non adhérentes et enfin, séché près du Bec Bünsen. Une photographie du biofilm obtenu est présentée Figure IV- 14.

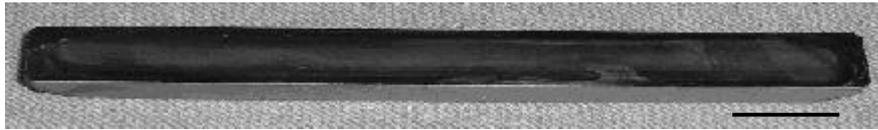


Figure IV- 14 : Photographie d'un biofilm de *P. fluorescens* sur un cristal ATR de germanium après 3 h de passage de la suspension bactérienne dans la cellule à circulation (échelle : 1cm).

Plusieurs caractéristiques macroscopiques sont observables :

- le biofilm formé est opaque
- un recouvrement non uniforme est obtenu : le biofilm apparaît comme étant plus dense vers le centre du cristal ainsi qu'aux extrémités. De telles variations peuvent être liées à des changements de flux locaux
- bien que le biofilm ne soit pas uniformément réparti, aucune zone n'est cependant exempte de dépôt

Afin de préciser la nature du dépôt, des observations microscopiques ont été menées sur l'ensemble du cristal et sont présentées au paragraphe suivant.

IV - IV.3.Aspect microscopique

Une série d'images microscopiques a été collectée sur deux zones A et B (représentées Schéma IV- 1) par observation d'un biofilm de *P. fluorescens* âgé de 3 h, sous le microscope optique et à épifluorescence et sont rassemblées sur la Figure IV- 15.

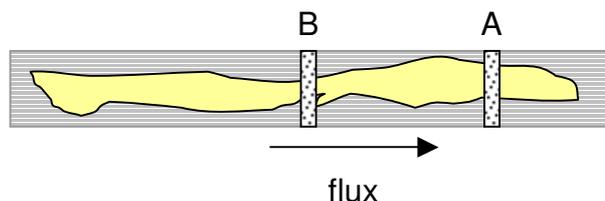


Schéma IV- 1 : Représentation du cristal de germanium (gris) et du biofilm (jaune). Les zones A et B correspondent aux parties du dépôt photographiées.

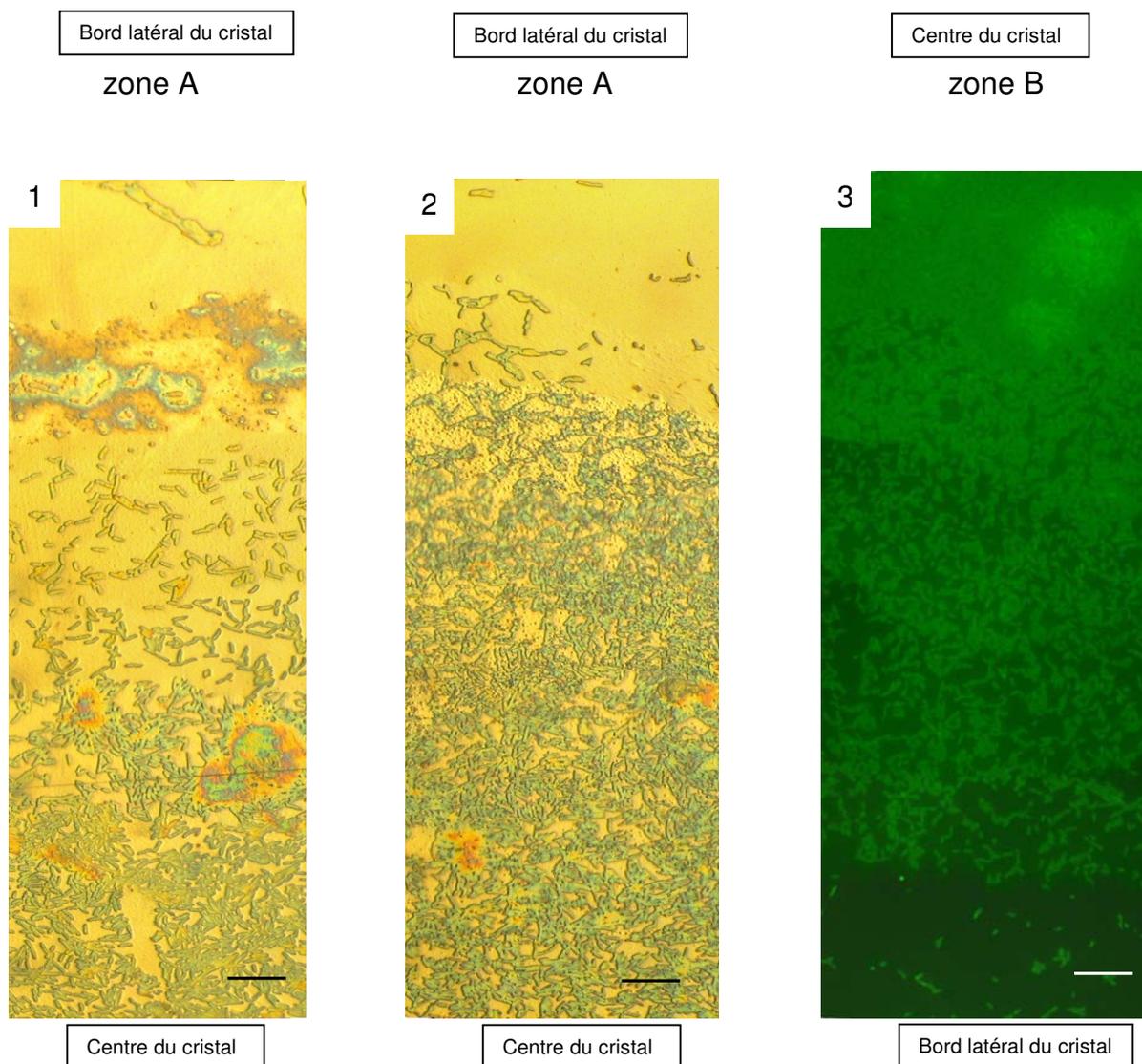


Figure IV- 15 : Photographies d'un biofilm de *P. fluorescens* âgé de 3 h , obtenues en plaçant le cristal de germanium sous le microscope optique (photographies n° 1 et 2) et après marquage au SYBR GREEN II (photographie n° 3). Objectif * 100 échelle : 15 μ m.

L'observation microscopique du biofilm formé montre :

- un dépôt non uniforme des cellules bactériennes à la surface du cristal
- un recouvrement latéral hétérogène : globalement une monocouche de bactéries s'est déposée, laissant des espaces non colonisés avec des amas cellulaires
- une densité cellulaire plus importante lorsque l'on s'éloigne des bords du cristal

Les observations par microscopie à épifluorescence (photo 3) confirment l'adhésion de bactéries à la surface du cristal. La surface couverte par les bactéries est d'environ $65 \pm 15\%$. Ces résultats sont en accord avec ceux émanant d'une étude réalisée par Korber et *al.*³¹.

Ce biofilm est hétérogène tant au niveau de sa composition que de sa structure (des amas

peuvent se former, certaines zones, très rares cependant, sont exemptes de dépôts ce qui peut être la conséquence de détachement de cellules).

IV - IV.4. Artefacts liés aux expériences pouvant perturber les spectres bactériens

La Figure IV- 16 et la Figure IV- 17. illustrent deux problèmes types auxquels nous avons dû faire face durant nos expériences et qui perturbent de façon significative les spectres et en conséquence, leur exploitation.

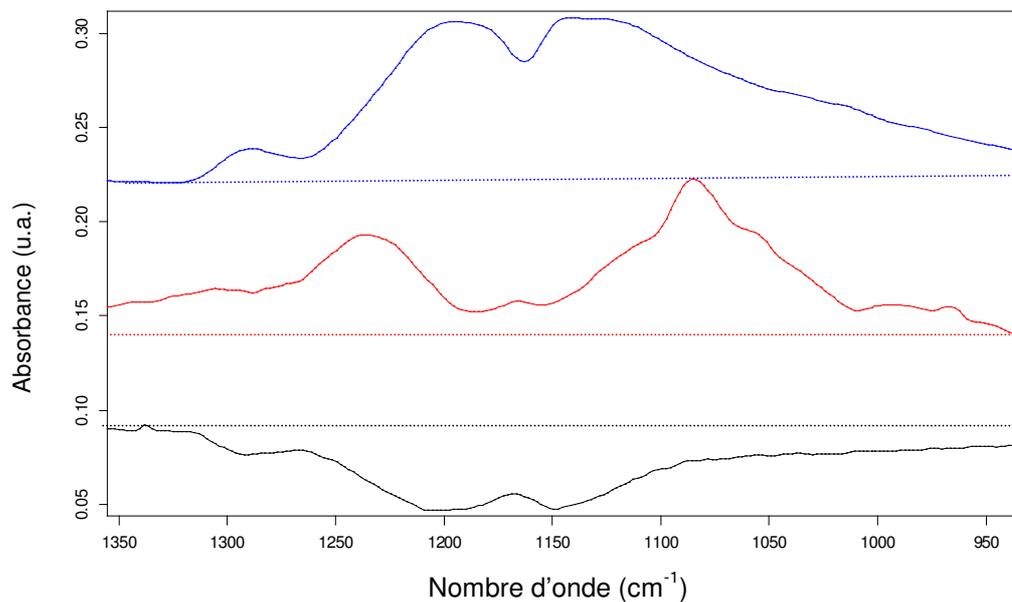


Figure IV- 16 : Déformations spectrales observables lors d'essais de formation de film conditionnant ou de biofilms. De haut en bas : spectres du joint Kalrez (bleu), spectre d'un biofilm sans trace de joint (rouge) et spectre de cellules adhérentes après 10 minutes d'inoculation de la suspension bactérienne à la surface du germanium (noir). Les traits pointillés représentent la ligne de base, entre 1400 et 900 cm^{-1} , de chaque spectre.

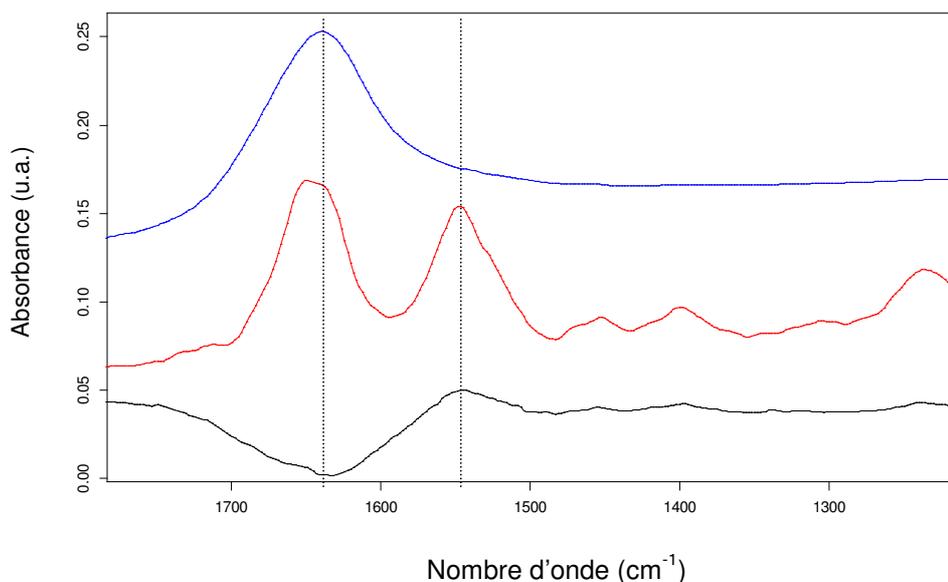


Figure IV- 17 : Déformations spectrales observables lors du passage d'une bulle d'air dans la cellule ATR. De haut en bas : spectres de l'eau (bleu), spectre d'un biofilm sans bulle d'air (rouge) et spectre de cellules adhérees après 1 heure d'inoculation de la suspension bactérienne à la surface du germanium (noir).

Lors de la circulation de milieu nutritif stérile pour pré-conditionner la surface du germanium, ou bien encore lors du passage de la suspension bactérienne, le joint Kalrez utilisé dans la cellule ATR pour maintenir l'étanchéité peut subir des déformations ou des déplacements (Figure IV- 16). Ceci pose un problème lors de la soustraction du spectre de référence au spectre de l'échantillon. En effet, les deux larges bandes centrées à 1192 et 1133 cm^{-1} , qui le caractérisent, interfèrent avec les bandes d'absorption de la région polysaccharidique.

Par ailleurs, la formation de bulle d'air au cours des expériences entraîne une mauvaise soustraction de l'eau à 1640 cm^{-1} (Figure IV- 19). Il en résulte une déformation (majeure) de la bande amide I et (mineure) de la bande amide II ce qui peut rendre la série de spectres inexploitable. En effet, dans ce cas, l'aire de la bande amide II ne peut être déterminée avec précision.

IV - V. Analyse de jeunes biofilms de *P. fluorescens* par microspectrométrie Raman

L'étude infrarouge qui vient d'être décrite nous a apporté d'une part, une vision globale de la composition biochimique du jeune biofilm qui s'est formé et d'autre part, nous a renseigné sur la vitesse de colonisation du cristal par les bactéries. Afin d'obtenir des analyses plus localisés des biofilms, nous les avons analysés par microspectrométrie Raman. Quelques exemples vont être présentés dans ce paragraphe.

Les biofilms, dont l'évolution a été préalablement suivie par IRTF-ATR, ont été rincés à l'eau apyrogène stérile puis, analysés par microspectrométrie Raman.

IV - V.1. Comparaison de spectres de *P. fluorescens* sous forme planctonique et sous forme sessile

Comparons, dans un premier temps, les spectres de diffusion Raman d'un culot de *P. fluorescens* en fin de phase exponentielle de croissance et d'un jeune biofilm de *P. fluorescens* âgé de 3h (Figure IV- 18).

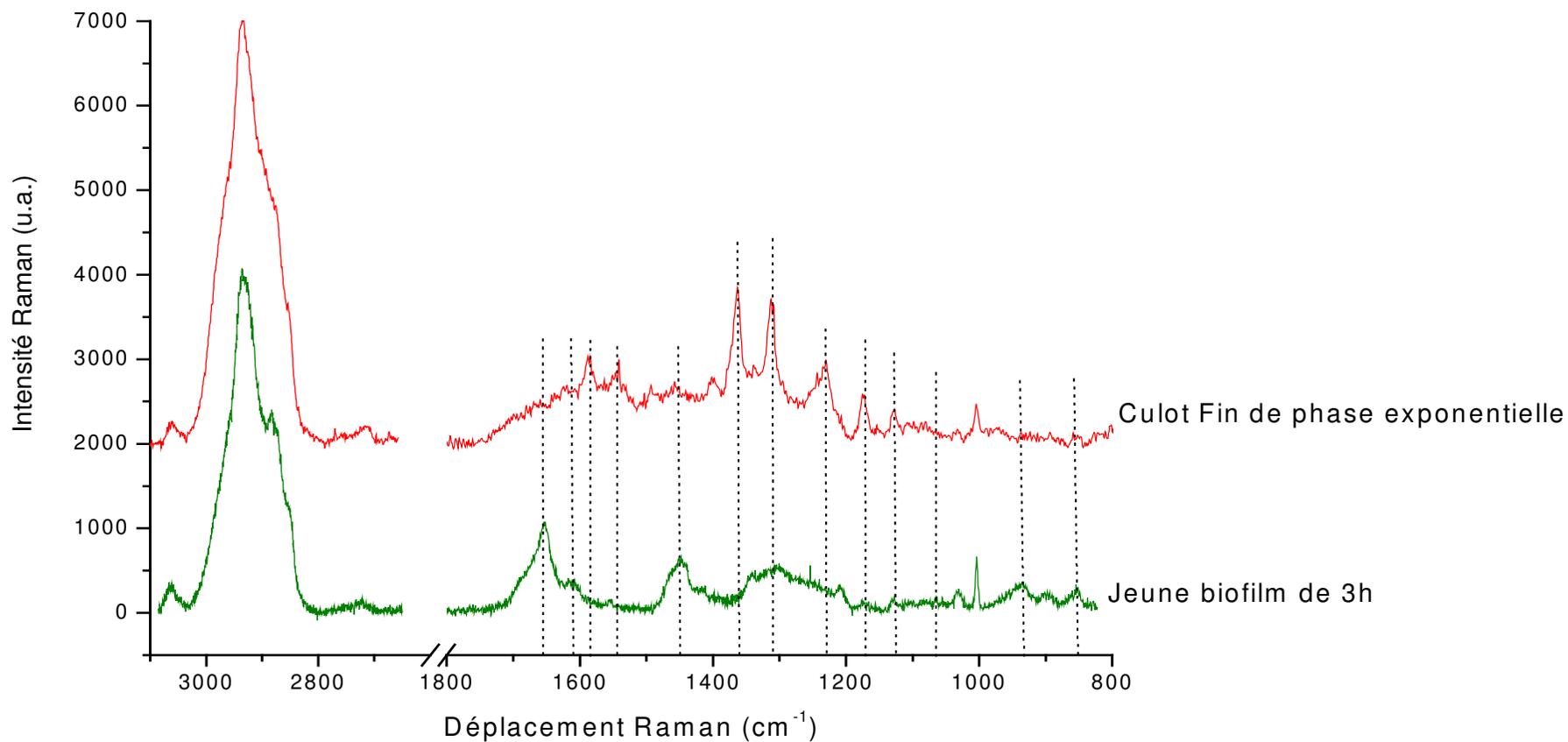


Figure IV- 18 : Spectre de diffusion Raman d'un culot *P. fluorescens* en fin de phase exponentielle de croissance (rouge, haut), et d'un biofilm de *P. fluorescens* âgé de 3 h (vert, bas). Le culot bactérien a été déposé sur cristal ATR de germanium. Les spectres ont été normalisés par rapport à la bande ν_{CH_2} , ν_{CH_3} centrée à 2930 cm^{-1} . Chaque spectre correspond à 2 accumulations de 120 s, la puissance du faisceau laser est d'environ 12 mW

Les spectres du culot en phase exponentielle (décrit au chapitre III, figure III-13 et III-14) et du biofilm présentent des profils distincts.

Bien que les élongations CH_2 , CH_3 dominent les deux types de spectres, les trois bandes intenses situées à 1311, 1362 et 1584 cm^{-1} observées sur le culot de bactéries en phase exponentielle, sont absentes du spectre du jeune biofilm. Elles semblent par conséquent liées aux culots bactériens et plus particulièrement aux cellules. D'après l'attribution des déplacements Raman effectuée au chapitre III (Tableau III-3), ces bandes semblent provenir d'acides aminés (Trp, Tyr, Phe). Par ailleurs, la comparaison du spectre du biofilm avec celui du milieu LB ne montre pas d'interférence, comme nous l'avions déjà remarqué avec les culots bactériens (c.f. chapitre III).

L'examen plus approfondi du spectre du jeune biofilm révèle la présence d'acides aminés tels que la phénylalanine (1003 et 1608 cm^{-1}), la tyrosine (830, 850 et 1618 cm^{-1}) et le tryptophane (1340 cm^{-1}) dont la contribution est cependant plus faible. La bande centrée à 3063 cm^{-1} , attribuée aux élongations C-H des carbones aromatiques, confirme la présence de ces composés aromatiques. Les bandes amide I et III situées respectivement à 1650 cm^{-1} et entre 1280 et 1210 cm^{-1} proviennent de protéines contenues dans l'échantillon avec probablement des proportions importantes d'hélices α ³². La bande amide II, apparaissant vers 1545 cm^{-1} , est également présente avec cependant une intensité faible. Enfin, le massif situé entre 3000 et 2800 cm^{-1} regroupe essentiellement la contribution des vibrations d'élongation CH_2 et CH_3 à 2854, 2886, 2936 et 2960 cm^{-1} . Le profil du spectre obtenu ici entre 800 et 3100 cm^{-1} est caractéristique des protéines^{25,33}.

Ces observations tendent à montrer que la zone de jeune biofilm analysée est constituée essentiellement de protéines.

IV - V.2. Comparaison de spectres de biofilms âgés de 5h

Les spectres présentés sur la Figure IV- 20 ont été obtenus à différents endroits d'un même biofilm de *P. fluorescens* âgé de 5 h.

Photo correspondante
au spectre n°1



Photo correspondante
au spectre n°2

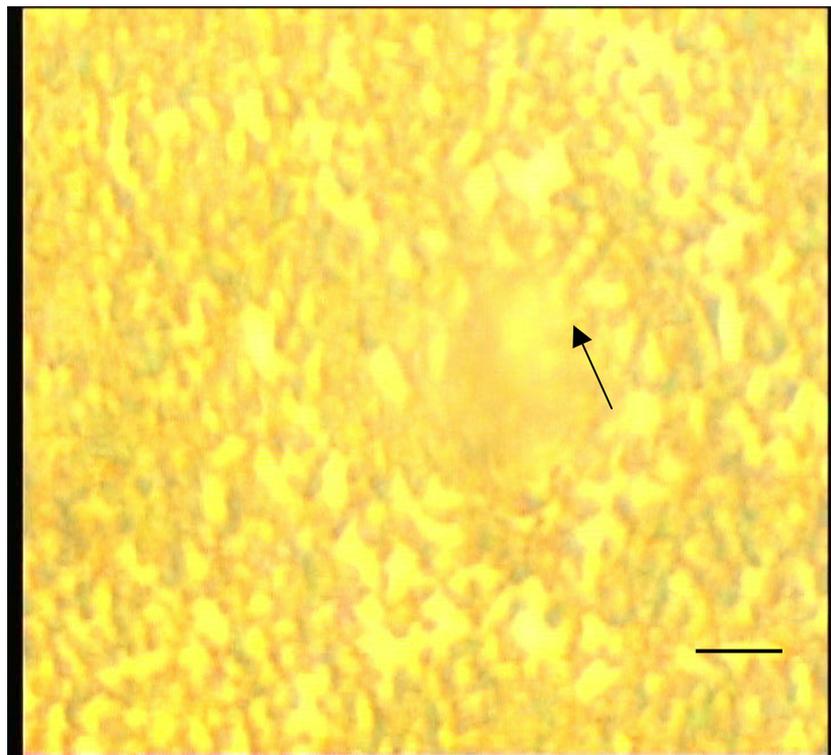


Figure IV- 19 : Observations au microscope optique d'un biofilm de *P. fluorescens* âgé de 5 h. La pointe des flèches indique la zone analysée en Raman. Echelle : 10 μ m.

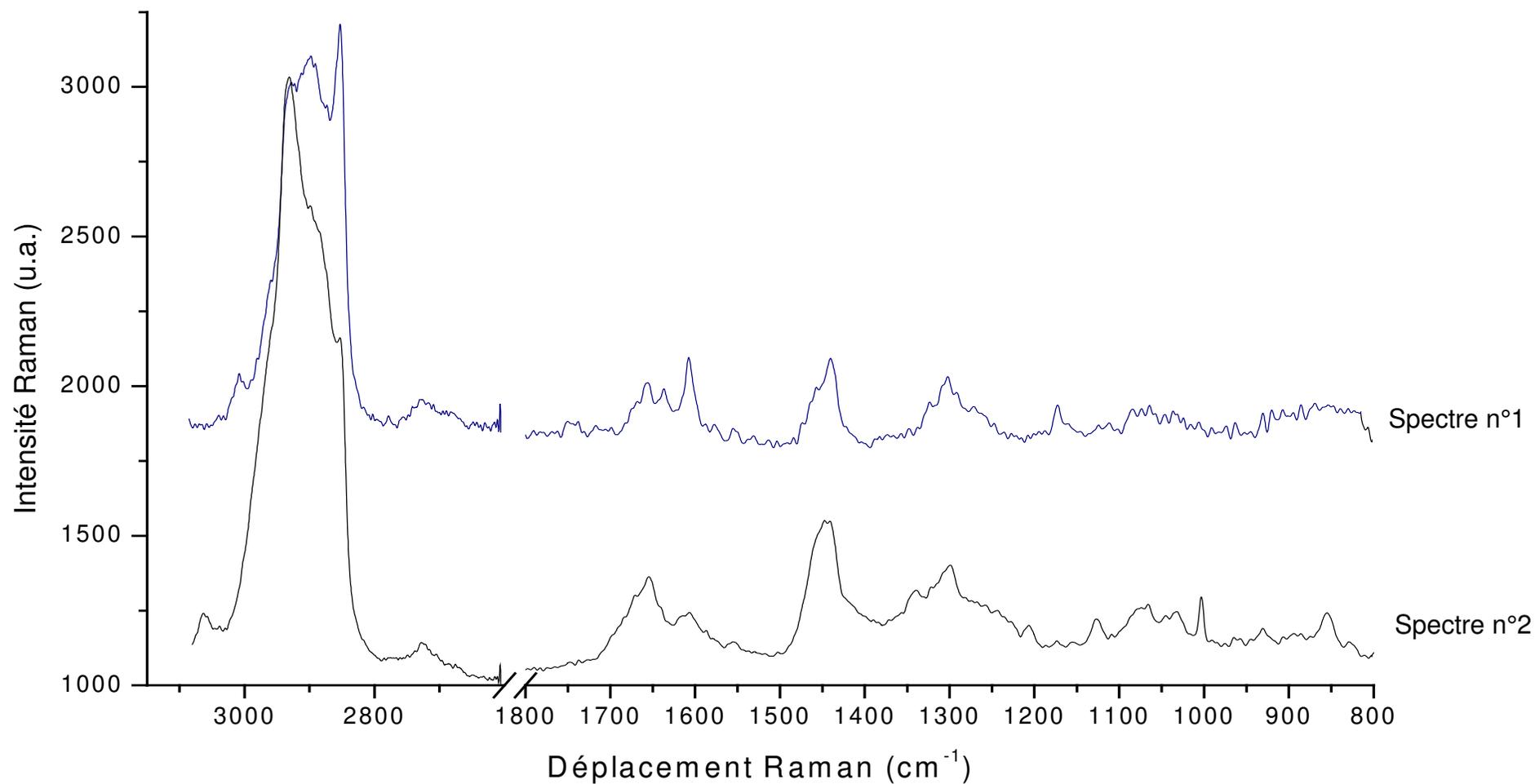


Figure IV- 20 : Spectre de diffusion Raman d'un biofilm de *P. fluorescens* âgé de 5 h à deux endroits différents. Chaque spectre correspond à 2 accumulations de 120 s, la puissance du faisceau laser est d'environ 12 mW au niveau de l'échantillon.

L'examen des spectres de jeunes biofilms âgés de 5 h montre des profils complètement différents (Figure IV- 20). Comme nous l'avons vu précédemment, les vibrations d'élongations CH₂ et CH₃, situées entre 3000 et 2800 cm⁻¹, dominent les spectres.

Spectre n°1 :

Ce spectre a été enregistré sur un amas de 10 µm environ dans une zone où le recouvrement du cristal est faible et hétérogène (Figure IV-19).

La très forte intensité relative de la bande située à 2850 cm⁻¹, attribuée aux élongations symétriques des groupes CH₂, laisse présumer l'existence de longues chaînes carbonées. Le profil spectral général du spectre et plus particulièrement la zone entre 2800 et 3000 cm⁻¹ est tout à fait similaire à celui présenté par Krafft et *al.*³⁴ pour un mélange lipides/cholestérol (bandes d'intensités décroissantes : 2936, 2886, 2854 cm⁻¹ et un épaulement à 2960 cm⁻¹). Cette observation est confirmée par la présence des bandes à 1302, 1128 et 1065 cm⁻¹, respectivement attribuées à la torsion des groupes CH₂, et aux élongations C-C symétrique et antisymétrique des groupes méthylènes appartenant à ces longues chaînes.

La bande centrée à 3008 cm⁻¹ est attribuée aux élongations C-H de carbones éthyléniques et la bande relativement fine à 1656 cm⁻¹ aux élongations C=C éthyléniques. Nous pouvons également remarquer la bande située à 1607 cm⁻¹ habituellement attribuée aux vibrations de cycles aromatiques et/ou de polyènes. L'absence de bandes à 1004cm⁻¹ ainsi qu'à 3060 cm⁻¹ (respectivement attribuées à la respiration du cycle benzénique et aux élongations C-H aromatiques) infirme la première hypothèse. Nous pouvons donc supposer l'existence de polyènes. La présence des bandes de diffusion à 1745 et 1710 cm⁻¹ attribuées respectivement aux liaisons C=O de fonctions ester et acide carboxylique permettent d'affirmer que l'amas analysé est constitué essentiellement de lipides de type acide gras insaturés.

Spectre n°2 :

Ce spectre a été enregistré dans une région du cristal ayant un grand recouvrement de bactéries présentant aussi des zones moins bien définies (trouble sur la photo). Il a été obtenu juste à la jonction entre ces deux zones (Figure IV- 20).

La bande à 3060 cm⁻¹ est attribuée aux élongations C-H de cycles aromatiques. Les bandes à 1003 et 1605 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations du cycle aromatique de la

phénylalanine et celles à 828, 855 et 1615 cm^{-1} à la tyrosine. La bande centrée à 1654 cm^{-1} , de largeur à mi hauteur plus grande que précédemment, est attribuée à la bande amide I des protéines.

Enfin, les bandes situées à 1300, 1127 et 1065 cm^{-1} peuvent être attribuées comme précédemment à des vibrations de groupement CH_2 de longues chaînes carbonées. Leur largeur de raie à mi-hauteur plus faible et leurs intensités de manière générale plus grande par rapport à l'autre spectre (Figure IV- 20) semblerait montrer ici une plus grande organisation de ces chaînes. Par ailleurs, l'absence des bandes tant vers 1740 cm^{-1} que vers 1710 cm^{-1} , attribuées respectivement aux élongations de groupes $\text{C}=\text{O}$ d'esters et d'acides carboxyliques, permet d'affirmer que ces chaînes grasses ne sont pas sous forme d'acides gras ou de phospholipides.

D'autres bandes de diffusion relativement intenses entre 1000 et 1100 cm^{-1} , généralement attribuées aux élongations $\text{C}-\text{C}$ et $\text{C}-\text{O}$ des carbohydrates, permettent d'émettre l'hypothèse de la présence de polysaccharides dans cette région du jeune biofilm.

Toutes ces observations indiqueraient la présence de lipoprotéines accompagnées de polysaccharides (ou de lipo- glyco- protéines).

Références bibliographiques du chapitre IV

1. Donlan R.M. *et al.* Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4980-4988 (2004).
2. Bryers J.D. & Characklis W.G. Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering* **24**, 2451-2476 (1982).
3. Walker S.L., Hill J.E., Redman J.A. & Elimelech M. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3093-3099 (2005).
4. Bruinsma G.M., Rustema-Abbing M., van der Mei H.C. & Busscher H.J. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* **45**, 95-101 (2001).
5. Manas P. & Mackey B.M. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary- phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1545-1554 (2004).
6. McWhirter M.J., McQuillan A.J. & Bremer P.J. Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZnSe and to TiO₂ monitored by ATR-FTIR spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**, 365-372 (2002).
7. McEldowney S. & Fletcher M. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 460-465 (1986).
8. Little B., Wagner P., Maki J.S., Walsch M. & Mitchell R. Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces. *The Journal of Adhesion* **20**, 187-210 (1986).
9. Geesey G.G. *et al.* Influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel. *Corrosion Science* **38**, 73-95 (1996).
10. Samuelsson M.T. & Kirchman D.L. Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3643-3648 (1990).
11. White D.C. *et al.* Biofilm ecology: on-line methods bring new insights into mic and microbial biofouling. *Biofouling* **10**, 3-16 (1996).
12. Nivens, D.E. *et al.* Monitoring microbial adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 199-213 (1993).

13. Pradier C.-M. *et al.* Surface characterisation of three marine bacteria strains by FT-IR, XPS and ToF-SIMS, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *The Journal of Physical Chemistry* **109**, 9540-9549 (2005).
14. Feo J.C., Castro M.A., Robles L.C. & Aller A.J. Fourier-transform infrared spectroscopic study of the interactions of selenium species with living bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 1601-1607 (2004).
15. Gué M., Dupont V., Dufour A. & Sire O. Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. *Biochemistry* **40**, 11938-11945 (2001).
16. Verdel-Zeroual W. Application de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à l'étude des comportements bactériens en fonction de l'environnement. Essai de reconnaissance de cible des antibactériens. 1994. Université de Reims. Ref Type: Thesis/Dissertation
17. Chittur K.K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* **19**, 357-369 (1998).
18. Kalaji M. & Neal A.L. IR study of self-assembly of capsular exopolymers from *Pseudomonas sp.* NCIMB 2021 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biopolymers* **57**, 43-50 (1999).
19. Sauer K. & Camper A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology* **183**, 6579-6589 (2001).
20. Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. & Davies D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**, 1140-1154 (2002).
21. Naumann D. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers R.A. (ed.), pp. 1-28 (John Wiley & Sons, Chichester,2000).
22. Helm D., Labischinski H., Schallehn G. & Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology* **137**, 69-79 (1991).
23. Dionex Corporation. Determination of amino acids in cell cultures and fermentation broths. Application Note 150. 2003. Ref Type: Report
24. Wright W.W. & Vanderkooi J.M. Use of IR absorption of the carboxyl group of amino acids and their metabolites to determine pKs, to study proteins, and to monitor enzymatic activity. *Biospectroscopy* **3**, 457-467 (1997).
25. Maquelin,K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **51**, 255-271 (2002).

26. Baier R.E. Influence of the initial surface condition of materials on biadhesion. 1972. Gaithersburg USA. Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling. Ref Type: Conference Proceeding
27. Rubio C. Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas fragi* K1 adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **24**, 193-205 (2002).
28. Kjelleberg S., Humphrey B.A. & Marshall K.C. Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 978-984 (1983).
29. James G.A., Koerber D.R., Caldwell D.E. & Costerton J.W. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology* **177**, 907-915 (1995).
30. Suci P.A., Vraný J.D. & Mittelman M.W. Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials* **19**, 327-339 (1998).
31. Korber,D.R., Lawrence J.R. & Caldwell,D.E. Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1421-1429 (1994).
32. Spiro,T.G. & Gaber,B.P. Laser Raman scattering as a probe of protein structure. *Annual Review of Biochemistry* **46**, 553-572 (1977).
33. Krafft C., Knetschke T., Siegner A., Funk R.H.W. & Salzer R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **32**, 75-83 (2003).
34. Krafft,C., Knetschke,T., Siegner,A., Funk,R.H.W. & Salzer,R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **32**, 75-83 (2003).

Table des illustrations du chapitre IV

FIGURE IV- 1 : EVOLUTION DU SPECTRE IR DE <i>P. FLUORESCENS</i> DURANT 3 H DE PASSAGE DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE D'UN CRISTAL DE GERMANIUM.	132
FIGURE IV- 3 : SPECTRES IR-ATR DE DEUX CULOTS DE <i>P. FLUORESCENS</i> RESPECTIVEMENT EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE ET APRES 3 H EN SUSPENSION DANS DU LB A 0,5 G/L, COMPARES AU SPECTRE, OBTENU <i>IN SITU</i> , DE CELLULES ADHEREES AU GERMANIUM APRES PASSAGE DE 3 H DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU CRISTAL. LES SPECTRES ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE AMIDE II CENTREE A 1548 CM ⁻¹ APRES CORRECTION DE LEUR LIGNE DE BASE ET SOUSTRACTION DE LA VAPEUR D'EAU RESIDUELLE. ILS ONT EGALEMENT ETE DECALES POUR PLUS DE LISIBILITE. (HAUT) : VUE GENERALE, (BAS) : AGRANDISSEMENT.	133
FIGURE IV- 4 : DERIVEES SECONDES DES TROIS SPECTRES PRESENTES FIGURE IV-2. LA CORRESPONDANCE DE CHAQUE DERIVEE EST INDIQUEE A DROITE.	135
FIGURE IV- 5 : PHOTOGRAPHIES AU MICROSCOPE OPTIQUE DE CELLULES DE <i>P. FLUORESCENS</i> ADHEREES APRES 2 H 40 (A GAUCHE) ET 5 H 10 (A DROITE), DE CIRCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU GERMANIUM. LE GROSSISSEMENT X100 A ETE UTILISE ET LES CELLULES SONT OBSERVEES SANS MARQUAGE. L'ECHELLE REPRESENTE 10 μM.	138
FIGURE IV- 6 : EVOLUTION DE L'AIRES DE LA BANDE AMIDE II EN FONCTION DU NOMBRE D'UFC /CM ² ADHEREES A LA SURFACE DU CRISTAL DE GERMANIUM, AU BOUT DE CINQ TEMPS DIFFERENTS DE CIRCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU GERMANIUM : T = 2 H 25, 2 H 40, 3 H, 5 H, 5 H 20.....	139
FIGURE IV- 7 : SPECTRES IR DU MILIEU LB EN POUFRE ENREGISTRE EN TRANSMISSION (HAUT). SPECTRE DES COMPOSES PRESENTS DANS LE LB ADSORBES A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM APRES 24H DE CIRCULATION DU BOUILLON STERILE A 0,5 G/L.....	142
FIGURE IV- 8 : CINETIQUE D'ADSORPTION DES PROTEINES PRESENTES DANS LE BOUILLON STERILE LB A 0,5 G/L, A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM.....	144
FIGURE IV- 9 : EVOLUTION DES BANDES AMIDE II, CENTREE A 1548 CM ⁻¹ (LOSANGES) ET PS, CENTREE A 1085 CM ⁻¹ (CARRES) EN FONCTION DU TEMPS D'INOCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE <i>P. FLUORESCENS</i> A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM RECOUVERT (SYMBOLES PLEINS) OU NON (SYMBOLES VIDES) D'UN FILM CONDITIONNANT (FC) PREALABLE. LE FC A ETE OBTENU PAR PASSAGE D'UN BOUILLON LB STERILE A 0,5 G/L, SUR LE CRISTAL, PENDANT 24H. LES DEUX TYPES D'EXPERIENCE ONT ETE REPETEES TROIS FOIS, A PARTIR DE TROIS INOCULA DIFFERENTS. LA FLECHE INDIQUE UN POINT D'INFLEXION APPARAISSANT UN PEU AVANT 1 H 30 DE CIRCULATION.....	145
FIGURE IV- 10 : EVOLUTION DE L'AIRES DE LA BANDE AMIDE II LORS DE L'ADHESION DE <i>P. FLUORESCENS</i> A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM. LES BACTERIES ONT ETE INOCULEES DANS DU BOUILLON LB CONCENTRE A 5 G/L (TRIANGLES), 0,5 G/L (ETOILES) ET 0,05 G/L (LOSANGES). POUR CHAQUE EXPERIENCE, LE CRISTAL DE GERMANIUM A ETE PRE-	

CONDITIONNE PAR PASSAGE DE SOLUTIONS DE LB STERILES RESPECTIVEMENT A 5, 0,5 ET 0,05 G/L	147
FIGURE IV- 12 : CINETIQUES D'ADHESION DE <i>P. FLUORESCENS</i> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN BACTERIES. TROIS CONCENTRATIONS BACTERIENNES SONT REPRESENTEES : TRIANGLES ROUGE ($DO_1 = 0,32$ EQUIVALANT A $5,6 \times 10^8$ UFC/ML) ; LOSANGE BLEU ($DO_1 = 0,28$ EQUIVALANT A ENVIRON 10^8 UFC / ML) ; ETOILES BLEU ($DO_1 = 0,17$ EQUIVALANT A $4,1 \times 10^7$ UFC / ML). IL N'Y A PAS DE FILM CONDITIONNANT DE LB PREETABLI A LA SURFACE DES CRISTAUX, AVANT LE PASSAGE DE LA SUSPENSION.....	148
FIGURE IV- 13 : EVOLUTION DES AIRES DES PRINCIPALES BANDES IR INDIQUEES SUR LES SPECTRES PRECEDENTS.	149
FIGURE IV- 14 : EVOLUTION DES UFC DANS LA SUSPENSION D'INOCULATION LORS D'UNE MANIPULATION DE FORMATION D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> A LA SURFACE D'UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM.....	150
FIGURE IV- 15 : EVOLUTION DU PROFIL SPECTRAL IR DE <i>P. FLUORESCENS</i> AU COURS DE SON ADHESION SUR CRISTAL ATR DE GERMANIUM AU BOUT DE 1 H, 3 H, 18 H ET 26 H. LES SPECTRES ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE AMIDE II.....	152
FIGURE IV- 16 : PHOTOGRAPHIE D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> SUR UN CRISTAL ATR DE GERMANIUM APRES 3 H DE PASSAGE DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DANS LA CELLULE A CIRCULATION (ECHELLE : 1CM).....	154
FIGURE IV- 17 : PHOTOGRAPHIES D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> AGE DE 3 H , OBTENUES EN PLAÇANT LE CRISTAL DE GERMANIUM SOUS LE MICROSCOPE OPTIQUE (PHOTOGRAPHIES N° 1 ET 2) ET APRES MARQUAGE AU SYBR GREEN II (PHOTOGRAPHIE N° 3). OBJECTIF * 100 ECHELLE : $15 \mu\text{M}$	155
FIGURE IV- 18 : DEFORMATIONS SPECTRALES OBSERVABLES LORS D'ESSAIS DE FORMATION DE FILM CONDITIONNANT OU DE BIOFILMS. DE HAUT EN BAS : SPECTRES DU JOINT KALREZ (BLEU), SPECTRE D'UN BIOFILM SANS TRACE DE JOINT (ROUGE) ET SPECTRE DE CELLULES ADHEREES APRES 10 MINUTES D'INOCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU GERMANIUM (NOIR). LES TRAIT POINTILLES REPRESENTENT LA LIGNE DE BASE, ENTRE 1400 ET 900 cm^{-1} , DE CHAQUE SPECTRE.....	156
FIGURE IV- 19 : DEFORMATIONS SPECTRALES OBSERVABLES LORS DU PASSAGE D'UNE BULLE D'AIR DANS LA CELLULE ATR. DE HAUT EN BAS : SPECTRES DE L'EAU (BLEU), SPECTRE D'UN BIOFILM SANS BULLE D'AIR (ROUGE) ET SPECTRE DE CELLULES ADHEREES APRES 1 HEURE D'INOCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU GERMANIUM (NOIR)..	157
FIGURE IV- 21 : SPECTRE DE DIFFUSION RAMAN D'UN CULOT <i>P. FLUORESCENS</i> EN FIN DE PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE (ROUGE, HAUT), ET D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> AGE DE 3 H (VERT, BAS). LE CULOT BACTERIEN A ETE DEPOSE SUR CRISTAL ATR DE GERMANIUM. LES SPECTRES ONT ETE NORMALISES PAR RAPPORT A LA BANDE ν_{CH_2} , ν_{CH_3} CENTREE A 2930 cm^{-1} . CHAQUE SPECTRE CORRESPOND A 2 ACCUMULATIONS DE 120 S, LA PUISSANCE DU FAISCEAU LASER EST D'ENVIRON 12 MW AU NIVEAU DE L'ECHANTILLON.	159
FIGURE IV- 19 : OBSERVATIONS AU MICROSCOPE OPTIQUE D'UN BIOFILM DE <i>P. FLUORESCENS</i> AGE DE 5 H. LA POINTE DES FLECHES INDIQUE LA ZONE ANALYSEE EN RAMAN. ECHELLE : $10 \mu\text{M}$.	161

FIGURE IV- 23 : SPECTRE DE DIFFUSION RAMAN D'UN BIOFILM DE *P. FLUORESCENS* AGE DE 5 H A DEUX ENDROITS DIFFERENTS. CHAQUE SPECTRE CORRESPOND A 2 ACCUMULATIONS DE 120 S, LA PUISSANCE DU FAISCEAU LASER EST D'ENVIRON 12 MW AU NIVEAU DE L'ECHANTILLON. 162

SCHEMA IV- 1 : REPRESENTATION DU CRISTAL DE GERMANIUM (GRIS) ET DU BIOFILM (JAUNE). LES ZONES A ET B CORRESPONDENT AUX PARTIES DU DEPOT PHOTOGRAPHIEES. 154

Chapitre V : Réponse d'un
jeune biofilm de *Pseudomonas
fluorescens* aux variations de
concentration en Carbone
Organique Dissous dans l'eau

Sommaire du chapitre V

V – I. Influence de la concentration en Carbone Organique Dissous dans l'eau testée.....	177
V – I.1. Réponse du biofilm exposé au milieu nutritif LB.....	177
V – I.2. Réponse du biofilm à l'eau de réseau.....	180
V – I.3. Comparaison de la réponse du biofilm de référence exposé à des échantillons d'eau contenant différentes quantités de COD.....	180
V – II. Evolution d'un biofilm de référence exposé successivement à des eaux contenant différentes quantités de COD.....	183
V – II.1. Cinétique d'évolution de la biomasse bactérienne sur 12 jours.....	183
V – II.1.1. Recroissance du biofilm dans un milieu plus riche en nutriments...	185
V – II.1.2. Evolution du profil spectral du biofilm en fonction du temps et de la concentration en COD.....	189
V – III. Intérêts de notre contribution dans le suivi de la biostabilité de l'eau du réseau.....	193
Références bibliographiques du chapitre V.....	195
Table des illustrations du chapitre V.....	199

Les résultats expérimentaux rapportés dans les chapitres III et IV nous ont permis d'obtenir les empreintes spectrales de *P. fluorescens* et de suivre son adhésion sur un cristal de germanium, en fonction de divers paramètres tels que le temps, la concentration en bactéries inoculées, la concentration en LB de la suspension d'inoculation, et la présence d'un film conditionnant. Nous avons montré que l'inoculation d'une suspension contenant environ 10^8 UFC / mL, dans du LB à 0,5 g/L, pendant 3 h, à l'obscurité, sous un débit de 0,7 mL / min sont les conditions expérimentales requises pour former un biofilm de référence monocouche de *P. fluorescens* à la surface d'un cristal de germanium. Ce dernier chapitre propose d'évaluer la réponse du jeune biofilm de référence aux variations de la quantité de COD présente dans l'eau, *via* ses empreintes spectrales IRTF-ATR.

V - I. Influence de la concentration en Carbone Organique Dissous dans l'eau testée

V - I.1. Réponse du biofilm exposé au milieu nutritif LB

Avant de tester la réponse du jeune biofilm de 3 h à l'eau du réseau, nous l'avons exposé au milieu nutritif LB afin d'obtenir une réponse de 'référence'.

Après trois heures de circulation, la suspension bactérienne est remplacée par du milieu stérile LB à 0,5 g/L. La Figure V- 1 représente l'évolution de l'aire de la bande amide II en fonction du temps.

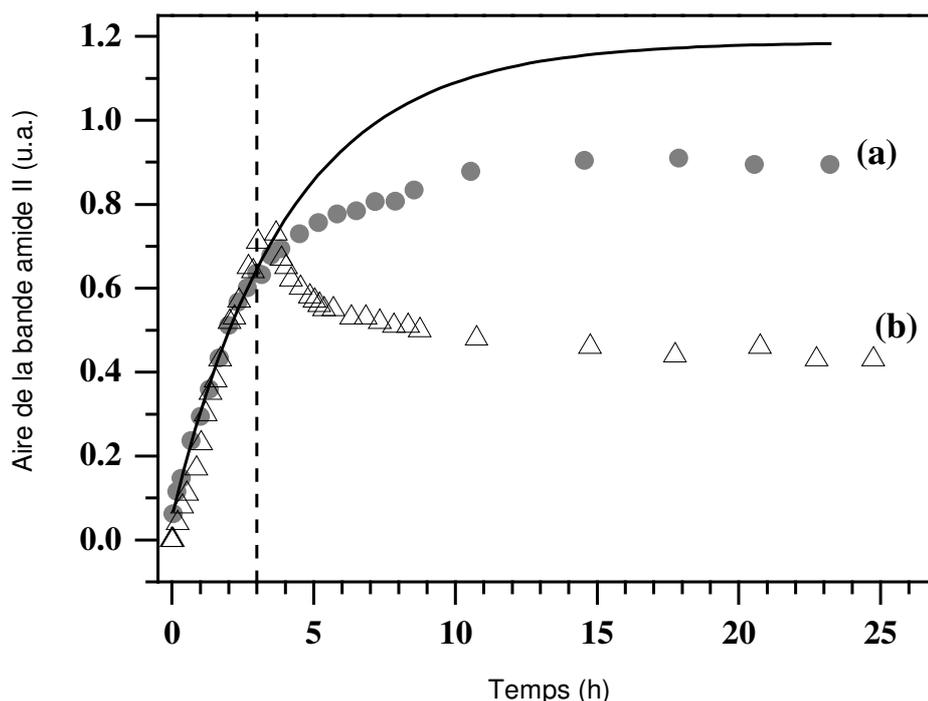


Figure V- 1 : Evolution de l'aire de la bande amide II en fonction du temps et de la concentration en COD. Après 3h de passage de la suspension bactérienne à la surface du cristal de germanium, le jeune biofilm a été exposé : (a) au milieu LB stérile (165 mgCOD/L), et (b) à l'eau du réseau stérilisée et déchlorée (2,8mgCOD/L) sous un débit constant et égal à 0,7 mL / min. La courbe en traits pleins représente l'ajustement non linéaire appliqué aux données représentant les 3h de circulation de la suspension bactérienne. Son équation est du type : $A = A_{\max} (1 - e^{-kt})$ ($k = 0,24 \text{ h}^{-1}$; coefficient de régression $R^2 = 0,997$)

Après trois heures d'inoculation dans la cellule à circulation, la suspension bactérienne a été remplacée par le milieu stérile LB à 0,5 g/L, le pH et la force ionique demeurant constants. Deux phases se distinguent en analysant la Figure V- 1 a): la première se situe entre 0 et environ 13 h, et correspond à une augmentation de l'aire de la bande amide II et la seconde débute à partir de 13 h et se caractérise par un plateau.

Bien qu'aucune bactérie ne soit inoculée dans la cellule, après 3h, les aires de toutes les bandes continuent à augmenter, comme ceci est illustré par l'aire de la bande amide II (a). Ce phénomène reflète le développement du biofilm : les cellules bactériennes se divisent, colonisent le cristal ATR¹ et produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS)^{2,3}. Ce dernier point relatif à la surproduction d'EPS par les cellules bactériennes lors de leur phase d'attachement à un substrat inerte a fait l'objet d'une littérature abondante⁴⁻⁸. Comme ceci a été décrit par Bosch et *al.*⁹ et Donlan et *al.*² la bande PS croit plus rapidement que les bandes amides I et II et les bandes situées vers 1240 cm^{-1} .

La seconde phase débute à partir de 13 h : les aires de toutes les bandes atteignent un plateau. Contrairement aux observations de Bremer et Geesey¹ les absorbances

mesurées dès le passage du milieu nutritif augmentent continûment et non brusquement. Ceci prouve que trois mécanismes, l'adhésion cellulaire, la division bactérienne et la sécrétion d'EPS, à la surface du germanium, se produisent simultanément dès le passage de la suspension bactérienne lors des trois premières heures. A la fin de la période d'inoculation, les deux derniers mécanismes prévalent.

Par ailleurs, il convient de noter que lors du changement de milieu d'inoculation (suspension bactérienne au milieu LB), une bulle d'air est introduite dans le circuit afin de ne pas mélanger les deux milieux. L'observation des spectres du biofilm avant et après le passage de cette bulle d'air montre une superposition parfaite prouvant que le passage de la bulle d'air n'altère pas la structure du biofilm, contrairement à certaines études réalisées notamment par Suci et *al.* (1997) ¹⁰.

L'observation de spectres collectés à différents temps de circulation du milieu LB, à la surface du jeune biofilm (Figure V- 2), montre également des modifications importantes au niveau du massif PS situé entre 1200 et 900 cm^{-1} . L'ajustement non linéaire présenté Figure V- 1 confirme l'existence d'un comportement distinct des bactéries lorsqu'elles sont mises en présence d'un milieu LB stérile.

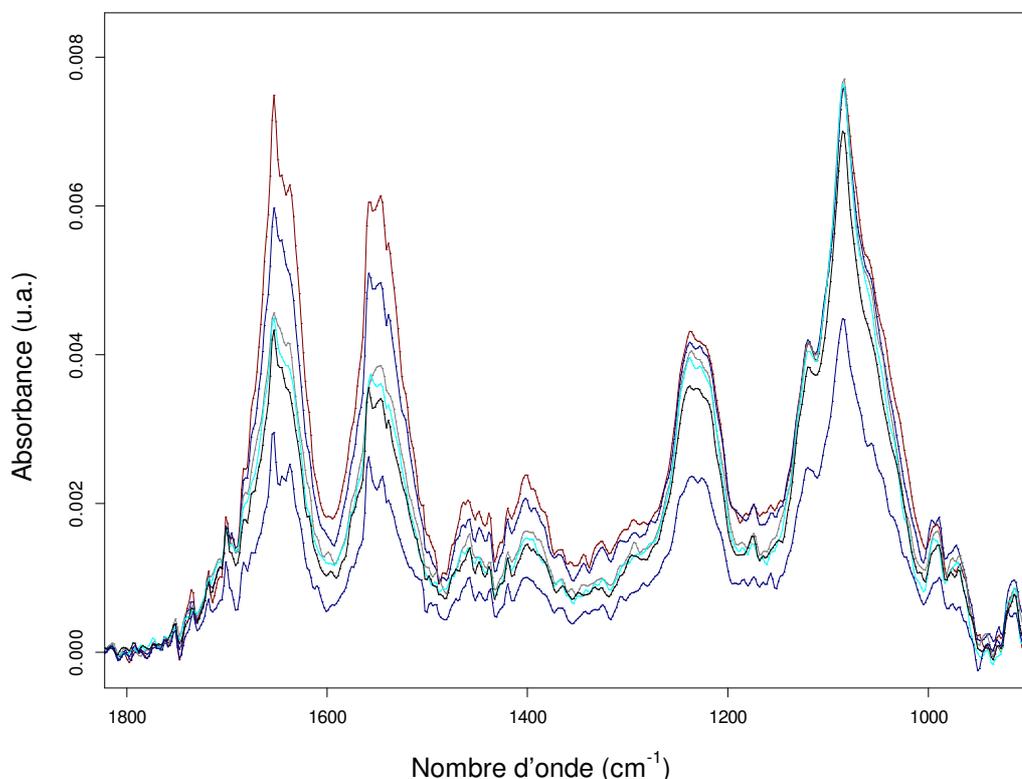


Figure V- 2 : Variations spectrales IR enregistrées lors du passage de la solution stérile de milieu LB à 0,5g/L, durant des temps variables (1 h en bleu, 2 h en noir, 3 h en cyan, 4 h en gris, 5 h en bleu foncé, 6 h en brun).

V - I.2.Réponse du biofilm à l'eau de réseau

Comme le montre la Figure V- 1, le développement du biofilm de référence (3 h) est différent lorsqu'il est exposé à de l'eau du réseau, moins nutritive que le LB à 0,5 g/L. Les autres paramètres tels que le pH, la température, la force ionique, les conditions hydrodynamiques et la concentration en dioxygène sont maintenus constants durant toutes les expériences. L'intensité de toutes les bandes n'augmente plus et commence à décliner dès la deuxième heure d'exposition du biofilm de référence à l'eau de réseau contenant 2,8 mgCOD/L. Alors que les absorbances n'évoluent plus dans la minute suivant le changement de pH ou de force ionique¹¹, dans cette expérience, elles diminuent continûment pendant 20 heures, pour finalement atteindre un plateau. Ce résultat est en accord avec l'interprétation donnée par Delaquis et *al.*¹² selon laquelle de jeunes biofilms se détachent partiellement lorsqu'ils sont soumis à des conditions de famine. Allison et *al.*¹³ ont suggéré que la dégradation enzymatique des EPS joue un rôle particulier dans le détachement des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* exposés à des conditions de carence nutritives. De plus, comme ceci a déjà été décrit par Horowitz et *al.*¹⁴ ou Walker¹⁵ les cellules qui croissent dans un milieu nutritif riche, tel que le LB, sont davantage sensibles au transfert vers un milieu plus pauvre.

La comparaison des spectres du jeune biofilm à différents temps de passage d'une eau de réseau contenant la même quantité de COD (résultats non présentés) montre une évolution de son profil spectral, tout comme nous l'avons observé précédemment lors du passage de la solution de LB stérile.

Enfin, la comparaison des expériences a) et b) reportées sur la Figure V- 1 montre que la réponse du jeune biofilm âgé de 3 h est différente selon qu'il est exposé à un milieu nutritif riche (165 mgCOD/L) ou à de l'eau du réseau (2,8 mgCOD/L).

V - I.3.Comparaison de la réponse du biofilm de référence exposé à des échantillons d'eau contenant différentes quantités de COD

Sur la Figure V- 3 sont présentées les évolutions de l'aire de la bande amide II en fonction du temps d'exposition du biofilm à l'eau du réseau contenant 3,4, 2,8 et 2,6 mgCOD/L.

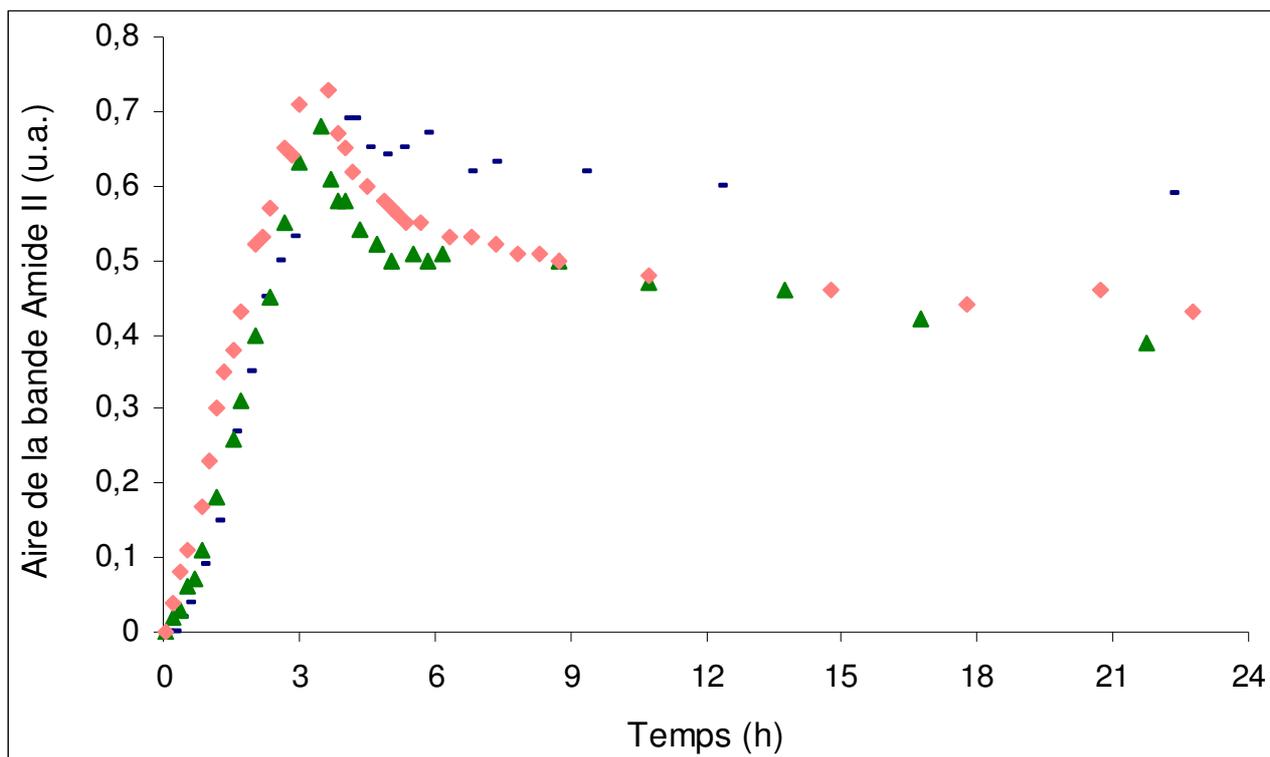


Figure V- 3 : Cinétiques d'évolution de l'aire des bandes amide II (losanges) en fonction du temps d'exposition du biofilm de référence à l'eau du réseau filtrée et déchlorée contenant 3,4 (traits bleu) ; 2,8 (losange rose) et 2,6mgCOD/L (triangles vert).

Après une diminution rapide (3 heures) et immédiate de l'aire de la bande amide II, lorsque le jeune biofilm est exposé à l'une des trois concentrations en COD testées, elle décroît plus lentement et tend vers un plateau. Plus la quantité de COD est grande et moins le décrochage bactérien est important.

La bande amide II ne représentant que les protéines présentes au sein du biofilm, nous avons observé les spectres de ce dernier après six heures d'expérience (c'est-à-dire trois heures de passage de la suspension bactérienne suivies de trois heures de passage de l'échantillon d'eau), pour les trois concentrations testées (Figure V- 4).

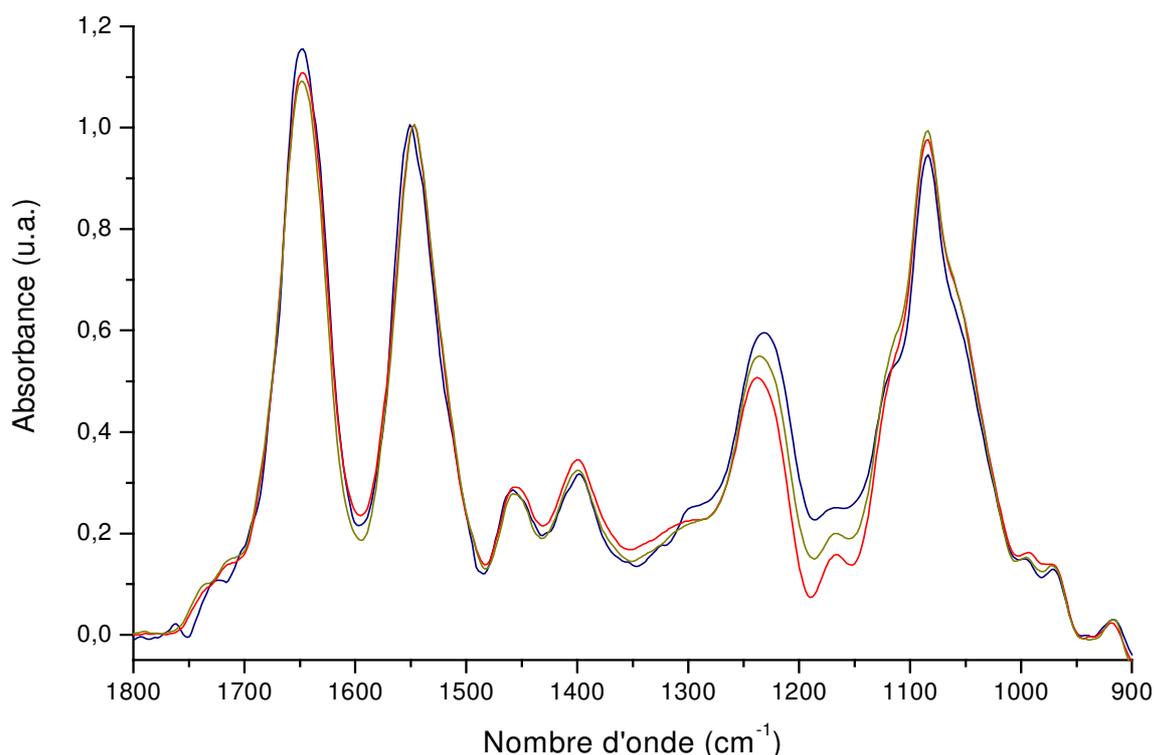


Figure V- 4 : Spectres des trois biofilms de *P. fluorescens* exposés durant 3 h à des eaux de réseau filtrées et déchlorées contenant 2,6 (brun), 2,8 (rouge) et 3,4 mgCOD/L (bleu).

Deux types de modifications sont perceptibles : un concerne le changement des intensités relatives de certaines bandes et l'autre, l'apparition d'épaulement. Lorsque le biofilm est exposé à l'eau de réseau la plus nutritive (3,4 mgCOD/L), une inversion des intensités relatives des bandes à 1240 et 1220 a lieu. De même, des épaulements apparaissent à 1120, 1328, 1413, 1506, 1587, et 1637 cm^{-1} . Ils pourraient être attribuables aux carbohydrates et aux protéines composant la matrice du biofilm ou encore des composés extracellulaires tels que le slime. Cependant, il ne s'agit que d'hypothèses qu'il faudra confirmer par des analyses plus approfondies et / ou d'autres manipulations complémentaires.

Ces résultats nous ont montré que lorsque le biofilm de référence est exposé à des quantités différentes de COD, l'évolution de l'aire de la bande amide II et plus largement, la modification de ses empreintes spectrales IR semblent être liées aux variations de COD.

V - II. Evolution d'un biofilm de référence exposé successivement à des eaux contenant différentes quantités de COD

D'après nos résultats précédents, nous avons montré que le biofilm répond différemment en fonction de la concentration en COD présente dans l'eau. Le but de cette partie est certes de confirmer nos résultats précédents mais également de suivre l'évolution du biofilm en fonction du temps dans le but de répondre à la question suivante : peut-on se servir du biofilm de référence pour effectuer une mesure ponctuelle de la stabilité microbologique de l'eau du réseau ou, peut-on l'utiliser plus longtemps ?

V - II.1. Cinétique d'évolution de la biomasse bactérienne sur 12 jours

Le biofilm de référence a été successivement exposé à du milieu nutritif stérile LB puis, à une série d'échantillons d'eau du réseau stérilisée et déchlorée. La concentration en COD de ces derniers varie entre 1,5 et 11,8 mg/L et leurs temps d'inoculation entre 15 et 50 h.

Comme ceci est illustré par l'évolution des aires de la bande amide II et PS (Figure V- 5), toute variation de la quantité de COD dans l'échantillon d'eau modifie rapidement la cinétique de développement du biofilm. Le temps de réponse de ce dernier s'échelonne entre 1 et 2 heures.

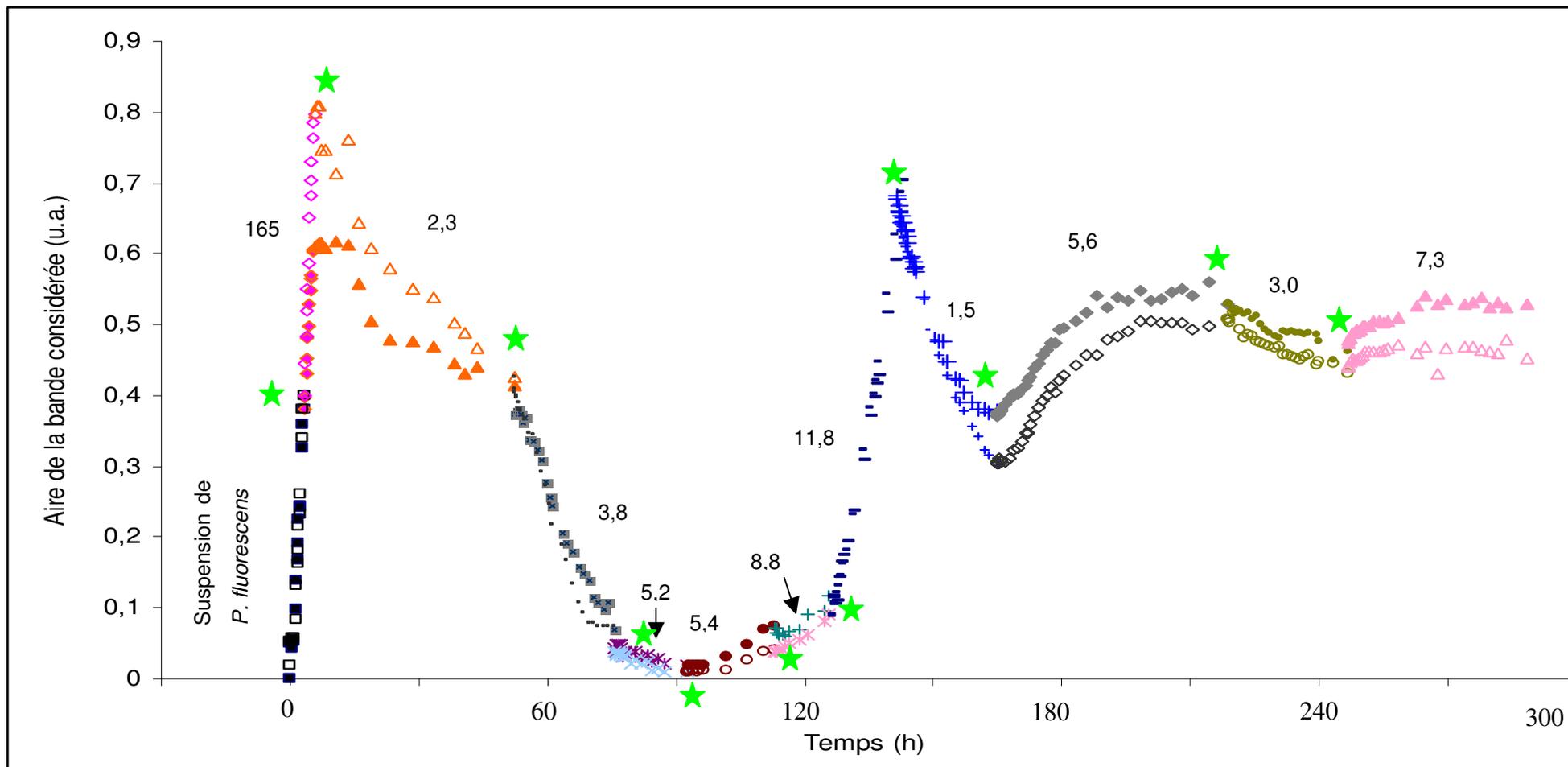


Figure V- 5 : Effets des variations de la quantité de COD présente et/ou ajoutée dans l'eau du réseau, en fonction du temps, sur l'évolution du biofilm de référence. Après la période d'incubation d'une durée de 3 h, le biofilm a été soumis à un flux de milieu stérile LB (165 mgCOD/L) durant 3 h puis, à une série d'échantillons d'eau du réseau filtrée et déchlorée. Les quantités de COD (en mg/L) sont indiquées pour chaque échantillon d'eau. L'aire de la bande amide II est représentée par les motifs pleins tandis que l'aire de la bande PS est représentée par les motifs creux. Les étoiles indiquent les temps auxquels les spectres seront discutés au § II.2.

Pour les échantillons d'eau dont la concentration en COD est inférieure à 5,3 mg/L, les aires des bandes diminuent continûment durant les 15 à 20 premières heures. Ceci traduit, comme sur la Figure V- 1 et la Figure V- 3, le détachement progressif du biofilm, suite à un manque de nutriments. La décroissance de l'aire de la bande amide II pourrait également être liée à une diminution de la taille des cellules qui adoptent une stratégie de survie suite au manque de nutriments, comme le suggèrent James et *al.*¹⁶. Cependant, dans leur étude comme dans celles réalisées par Amy et Morita¹⁷, et Novitsky et Morita¹⁸, la diminution de la taille des cellules s'accompagne d'une augmentation du nombre des cellules ce qui aurait pour conséquence une conservation de la biomasse. L'aire de la bande amide II ne subirait donc aucune variation.

Une tendance opposée est observable pour les échantillons d'eau contenant plus de 5,3mgCOD/L : l'intensité de toutes les bandes augmente. Ceci prouve que le biofilm recroît à la surface du cristal.

V - II.1.1.Recroissance du biofilm dans un milieu plus riche en nutriments

Intéressons-nous à la recroissance observée au bout de 125 h, lorsque le jeune biofilm est mis au contact d'un échantillon d'eau contenant 11,8 mgCOD/L.

Durant cette expérience, le rapport des aires amide II / PS reste constant et est identique à celui calculé lors de la période d'attachement initiale (entre 0 et 3 h). Ceci suggère que la recroissance du biofilm est principalement due à la croissance des bactéries adhérees à la surface. Comme on le voit sur la Figure V- 6, l'aire de la bande amide II croît exponentiellement en fonction du temps. Ceci traduit une croissance latérale exponentielle des quelques bactéries encore attachées à la surface du germanium. En considérant que l'augmentation de l'aire de la bande amide II est proportionnelle au nombre de bactéries adhérees à la surface, l'ajustement présenté Figure V- 6 donne une vitesse de croissance spécifique de $0,36 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est supérieure à celle obtenue pour les bactéries planctoniques ($0,29 \text{ h}^{-1}$). Un temps de génération plus faible dans le cas de bactéries sessiles, par rapport à celui calculé en suspension, a précédemment été observé par Bester et *al.*¹⁹ dans le cas des étapes initiales de formation de biofilms. De plus, cette vitesse de croissance rejoint celle trouvée par Mueller et *al.*²⁰ dans le cas de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* à la surface d'acier.

De précédentes études ont montré que de nombreuses bactéries adhèrent plus facilement après une période de carence nutritive ou bien après avoir poussé dans un milieu pauvre. De plus, les cellules bactériennes ayant cru dans des conditions nutritives restreintes, sont physiologiquement plus tolérantes que celles isolées de conditions nutritives plus riches. Ceci pourrait expliquer d'une part le fait que l'amplitude de la réponse du biofilm diminue en fonction du temps et d'autre part, les changements de profils spectraux observables à partir de 125 h.

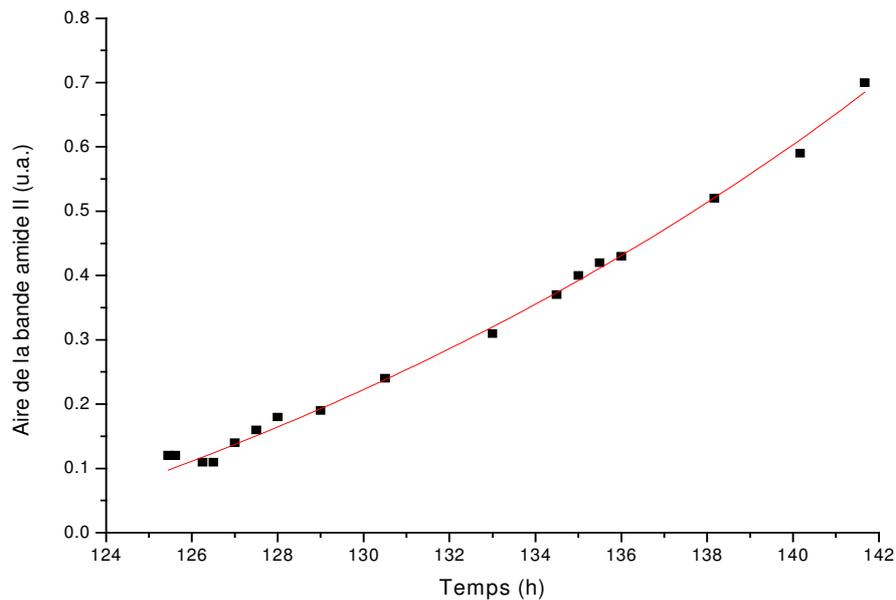


Figure V- 6 : Ajustement des cinétiques de la bande amide II lorsque le biofilm est exposé à une eau du réseau enrichie en COD (contenant 11,8 mgCOD/L, entre t = 126 h et t = 142 h sur la cinétique totale Figure V- 5). L'équation $A = A_1 \cdot \exp(t/t_1) + A_0$ correspondant à une croissance exponentielle a été utilisée.

Jusqu'à présent, les résultats présentés ont montré une cohérence entre le comportement du biofilm et la concentration de COD présente dans les eaux testées. Pour clore ce paragraphe, nous allons tenter d'établir une corrélation quantitative entre la vitesse de réponse du biofilm et les quantités de COD finales mesurées dans les eaux testées.

[COD] (mg/L)	Type d'évolution(s)	Pente
2,3	Plateau, linéaire, plateau	Négative : détachement 0,019 (entre 13 et 19h)
3,8	Plateau, linéaire	Négative : détachement 0,014
5,2	linéaire	Négative : détachement -0,002
5,4	Plateau, exponentielle	Positive : recroissance 0,003
8,8	Plateau, linéaire	Positive : recroissance 0,005
11,8	Plateau, exponentielle	Positive : recroissance 0,035
1,5	Décroissance exponentielle	Négative : détachement 0,022
5,6	Linéaire, plateau	Positive : recroissance 0,0076
3,0	Linéaire, plateau	Négative : détachement 0,004
7,3	Croissance, plateau	Positive : recroissance 0,0195

Tableau V- 1 : récapitulatif des différentes évolutions observées en fonction de la quantité de COD (mg / L) finale contenue dans les échantillons d'eau successifs auxquels le biofilm de 3 h a été soumis (c.f. Figure V-5).

Le tableau V-1 présente les différentes évolutions de l'aire de la bande amide II lorsque le biofilm est soumis à différents types d'eaux du réseau (expérience correspondante à la Figure V-5). Les pentes indiquées ont été calculées sur les 4 premières heures de la partie linéaire (qu'elle se situe avant ou après le plateau) de réponse du biofilm.

En analysant le tableau V-1, on voit qu'un plateau précède ou suit une évolution linéaire, le plus généralement. Par ailleurs, une concentration en COD supérieure à 5,2 mg/L entraîne une recroissance du biofilm alors qu'une concentration inférieure entraîne sa

décroissance. Ceci montre d'une part qu'il existe une concentration seuil en-dessous de laquelle, le biofilm doit adapter sa physiologie pour répondre au stress extérieur. D'autre part, le plateau présent, pour la plupart des réponses, montre que quelle que soit la concentration en COD testée, le biofilm revient toujours à un état d'équilibre.

Portons, à présent, la vitesse d'évolution de l'aire de la bande amide II en fonction de la concentration en COD présente dans l'eau testée (Figure V- 7).

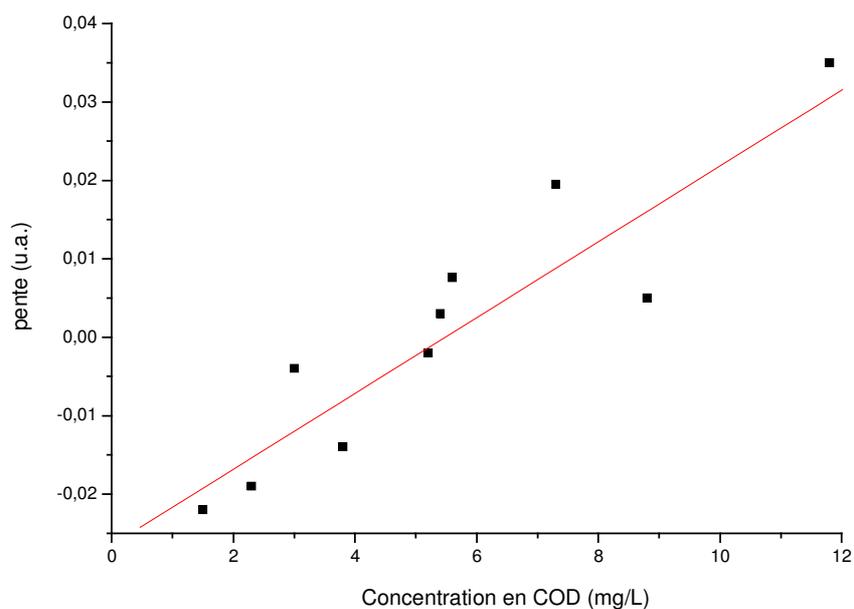


Figure V- 7 : Essai de corrélation entre la vitesse d'évolution de l'aire de la bande amide II et la concentration en COD présente / ajoutée dans l'eau du réseau filtrée et déchlorée.

Une tendance linéaire apparaît entre la concentration en COD de l'eau et la vitesse d'évolution de l'aire de la bande amide II. Le coefficient de corrélation trouvé ($R^2 = 0,85$) est cependant faible. Plusieurs remarques peuvent être faites à ce propos :

- Tout d'abord, l'obtention d'une relation plus précise nécessiterait de répéter ces expériences en vue de les confirmer
- Ensuite, la physiologie des bactéries évoluant au cours du temps, il faudrait exposer le biofilm à différentes quantités de COD, sur un temps n'excédant pas 48 h
- Enfin, les bactéries étant des organismes vivants, il est peut être difficile d'exiger d'elles un comportement reproductible : ceci pourrait expliquer la forte dispersion obtenue.

V - II.1.2. Evolution du profil spectral du biofilm en fonction du temps et de la concentration en COD

L'évolution du profil spectral du biofilm soumis à l'eau du réseau est présentée sur la Figure V- 8.

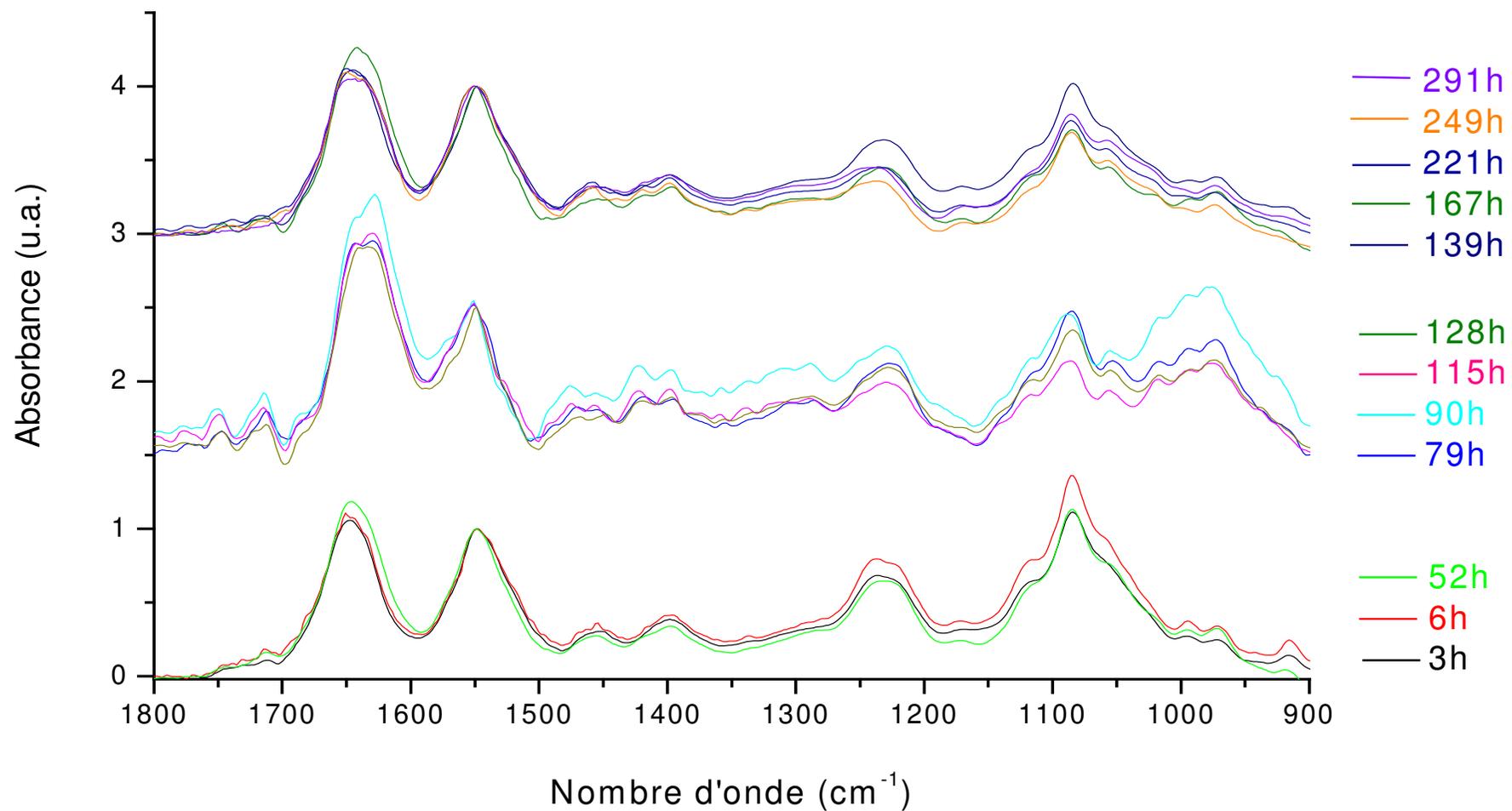


Figure V- 8 : Evolution du profil spectral des bactéries adhérentes en fonction du temps d'exposition du biofilm de référence aux échantillons d'eau du réseau. Les spectres ont été normés par rapport à la bande amide II.

Les spectres correspondant à la fin du passage de chaque échantillon d'eau du réseau additionnée de COD sont présentés et ont été répartis en trois groupes.

- 1) Le premier correspond aux spectres enregistrés entre 0 et 52 h. Après 3 h de passage de la suspension bactérienne, 3 h de LB à 165 mgCOD/L et 44 h d'eau du réseau contenant 2,3 mgCOD/L, les spectres des bactéries adhérees sont semblables. L'intensité relative des bandes PS est supérieure à celle de la bande amide II ce qui montre que la sécrétion d'EPS et la synthèse d'acides nucléiques ont débuté.
- 2) Le second groupe correspond aux spectres collectés entre 79 et 128 h, période qui correspond au déclin de l'aire de la bande amide II (Figure V- 5). L'examen des spectres présentés Figure V- 8 montre une modification importante du massif situé entre 1150 et 900 cm^{-1} , qui pourrait correspondre aux produits sécrétés par les bactéries. Il se pourrait que lorsqu'elles quittent la surface du cristal, les substances sécrétées par les bactéries y restent. Il ne s'agit cependant que d'une hypothèse. Le rapport signal / bruit étant mauvais, nous émettons des réserves quant à l'interprétation de ces bandes. On note également une modification de l'intensité relative des bandes amides I et II : au bout de 52 h de circulation, les deux intensités sont quasiment identiques puis, celle de la bande amide I devient de plus en plus importante.
- 3) Le troisième groupe, rassemble les spectres enregistrés entre 139 et 291 h. Leur allure générale est proche de celle observée dans le cas des spectres collectés durant les cinquante premières heures. Quelques différences peuvent cependant être repérées. Elles concernent notamment le profil des PS, celui du massif situé entre 1250 et 1200 cm^{-1} ainsi que la valeur plus importante du rapport protéines / PS.

V - III. Intérêts de notre contribution dans le suivi de la biostabilité de l'eau du réseau

Au fur et à mesure de l'accumulation des cellules à la surface d'un matériau, des bactéries peuvent être relarguées du biofilm vers la solution, en réponse à des changements environnementaux. Une telle perte de cellules peut être le résultat soit d'un détachement 'naturel', d'une lyse cellulaire, d'un manque d'oxygène, de modifications des conditions hydrodynamiques ou bien encore d'autres facteurs chimiques²¹⁻²³. Dans notre étude, exceptés la lyse cellulaire et le détachement naturel de cellules au cours du temps, les autres facteurs expérimentaux restent constants. Les fluctuations observées lorsque le biofilm de référence est soumis à des échantillons d'eau contenant différentes quantités de COD sont en relation avec ces dernières. Le système mis en œuvre présente de ce fait un grand intérêt pour suivre la biostabilité de l'eau du réseau.

Afin de percevoir tout l'intérêt du biocapteur potentiel que constitue le biofilm de référence de *P. fluorescens* présenté au cours de cette thèse, il est nécessaire de rappeler quelques points. Tout d'abord, la Figure V- 5 peut suggérer qu'un analyseur de COD, placé en ligne, pourrait suffire à suivre la biostabilité de l'eau du réseau. Or, bon nombre d'études ont montré que la proportion de matière organique assimilable (AOC) ou biodégradable (BDOC) contenue dans le carbone organique total varie considérablement^{24,25}. C'est pourquoi les méthodes standard évaluant la biostabilité de l'eau du réseau sont basées sur la détermination des concentrations en AOC et BDOC²⁶. Cependant, ces dernières sont longues et aboutissent parfois à des résultats contradictoires²⁷.

La méthode développée au cours de ma thèse ne présente pas ces limitations. En effet, elle offre la possibilité de suivre en continu, *in situ*, en temps réel et de manière non destructive le développement d'un biofilm naissant de *P. fluorescens* exposé à des échantillons d'eau du réseau contenant différentes quantités de COD. La source de carbone utilisée dans notre étude était le milieu nutritif des bactéries, le LB. L'intérêt de son utilisation a été de fournir des nutriments de nature diverse (acides aminés, acides nucléiques, des traces de carbohydrates) qui peuvent être apportés par la matière organique présente dans l'eau du réseau.

Enfin, des facteurs autres que le carbone organique peuvent être impliqués dans la croissance ou le détachement bactériens. Il peut s'agir, à titre d'exemples, de facteurs nutritionnels tels que la présence d'azote, de phosphore^{28,29} physico-chimiques tels que le pH, la force ionique^{11,30}, ou encore de l'état de surface du matériau à coloniser^{31,32}. A ceci s'ajoutent les propriétés de surface des microorganismes^{33,34} ainsi que leur activité^{35,36} ou bien encore l'influence de la phase de croissance dans laquelle les microorganismes se trouvent³⁷.

Références bibliographiques du chapitre V

1. Bremer P.J. & Geesey G.G. An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling* **3**, 89-100 (1991).
2. Donlan R.M. *et al.* Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4980-4988 (2004).
3. Marcotte L., Kegelaer G., Sandt C., Barbeau J. & Lafleur M. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Analytical Biochemistry* **361**, 7-14 (2007).
4. Allison D.G. & Sutherland I.W. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of Genetic Microbiology* **133**, 1319-1327 (1987).
5. Cheung H.Y., Sun S.Q., Sreedhar B., Ching W.M. & Tanner P.A. Alterations in extracellular substances during the biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* on aluminium plates. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 100-106 (2000).
6. Costerton J.W. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **22**, 551-563 (1999).
7. Sauer K. & Camper A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology* **183**, 6579-6589 (2001).
8. Vandevivere P. & Kirchman D.L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3280-3286 (1993).
9. Bosch A. *et al.* Characterization of *Bordetella petrusis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**, 736-747 (2006).
10. Suci P.A., Siedlecki K.J., Palmer JR R.J., White D.C. & Geesey G.G. Combined light microscopy and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4600-4603 (1997).
11. McWhirter M.J., Bremer P.J. & McQuillan A.J. Direct infrared spectroscopic evidence of pH- and ionic strength-induced changes in distance of attached *Pseudomonas aeruginosa* from ZnSe surfaces. *Langmuir* **18**, 1904-1907 (2002).
12. Delaquis P.J., Caldwell D.E., Lawrence J.R. & McCurdy A.R. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology* **18**, 199-210 (1989).
13. Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A. & Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* **167**, 179-184 (1998).

14. Horowitz A., Krichevsky M.I. & Atlas R.M. Characteristics and diversity of subarctic marine oligotrophic, stenoheterotrophic, and euryheterotrophic bacterial populations. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 527-535 (1983).
15. Walker S.L. The role of nutrient presence on the adhesion kinetics of *Burkholderia cepacia* G4g and ENV435g. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **45**, 181-188 (2005).
16. James G.A., Koerber D.R., Caldwell D.E. & Costerton J.W. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology* **177**, 907-915 (1995).
17. Amy P.S. & Morita R.Y. Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1109-1115 (1983).
18. Novitsky J.A. & Morita R.Y. Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation in a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 617-622 (1976).
19. Bester E, Wolfaardt G., Joubert L., Garny K. & Saftic S. Planktonic-cell yield of a Pseudomonad biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7792-7798 (2005).
20. Mueller, R.F. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research* **30**, 2681-2690 (1996).
21. Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C. & Heijnen, J.J. Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 205-218 (2001).
22. Applegate D.H. & Bryers J.D. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology Bioengineering* **37**, 17-25 (1991).
23. Chen X. & Stewart P.S. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research* **34**, 4229-4233 (2000).
24. Rizet M., Fiessinger F. & Houel N. Bacterial regrowth in a distribution system and its relationship with the quality of the feed water: case studies. Proceedings AWWA. 1199-1214. 1982. Miami Beach. Water Qual. Tech. Conf.
Ref Type: Conference Proceeding
25. Van der Kooij D., Visser A. & Hijnen W.A.M. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *Journal of American Water Works Association* **74**, 540-545 (1982).
26. Van Der Kooij, D. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety. Bartram, J., Cortuvo, J., Exner, M., Fricker, C. & Glasmacher, A. (eds.), pp. 199-232 (IWA Publishing, London, 2003).
27. Sharp R.R., Camper A.K., Crippen J.J., Schneider O.D. & Leggiero S. Evaluation of drinking water biostability using biofilm methods. *J. Environ. Eng.* **127**, 403-410 (2001).

28. Lehtola J.M., Miettinen I.T., Vartiainen T. & Martikainen P.J. Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. *Water Research* **36**, 3681-3690 (2002).
29. Roca C. & Olsson L. Dynamic responses of *Pseudomonas fluorescens* DF57 to nitrogen or carbon source addition. *Journal of Biotechnology* **86**, 39-50 (2001).
30. McWhirter M.J., McQuillan A.J. & Bremer P.J. Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZnSe and to TiO₂ monitored by ATR-FTIR spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**, 365-372 (2002).
31. Teughels W., Van Assche N., Sliepen I. & Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Impl. Res.* **17**, 68-81 (2006).
32. Pringle, J.H. & Fletcher, M. Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1321-1325 (1986).
33. Faille C. *et al.* Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 728-738 (2002).
34. Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.N. & Hebraud M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 728-737 (2002).
35. Meylheuc T. *et al.* Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **52**, 128-137 (2006).
36. van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W. & Zehnder A.J.B. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* **54**, 75-87 (1990).
37. Walker S.L., Hill J.E., Redman J.A. & Elimelech M. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3093-3099 (2005).

Table des illustrations du chapitre V

FIGURE V- 1 : EVOLUTION DE L'AIRES DE LA BANDE AMIDE II EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION EN COD. APRES 3H DE PASSAGE DE LA SUSPENSION BACTERIENNE A LA SURFACE DU CRISTAL DE GERMANIUM, LE JEUNE BIOFILM A ETE EXPOSE : (A) AU MILIEU LB STERILE (165 MGCOD/L), ET (B) A L'EAU DU RESEAU STERILISEE ET DECHLOREE (2,8MGCOD/L) SOUS UN DEBIT CONSTANT ET EGAL A 0,7 ML / MIN. LA COURBE EN TRAITS PLEINS REPRESENTE L'AJUSTEMENT NON LINEAIRE APPLIQUE AUX DONNEES REPRESENTANT LES 3H DE CIRCULATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE. SON EQUATION EST DU TYPE : $A = A_{MAX} (1-E^{-KT})$ (K = 0,24 H ⁻¹ ; COEFFICIENT DE REGRESSION R ² = 0,997)	178
FIGURE V- 2 : VARIATIONS SPECTRALES IR ENREGISTREES LORS DU PASSAGE DE LA SOLUTION STERILE DE MILIEU LB A 0,5G/L, DURANT DES TEMPS VARIABLES (1 H EN BLEU, 2 H EN NOIR, 3 H EN CYAN, 4 H EN GRIS, 5 H EN BLEU FONCE, 6 H EN BRUN).	179
FIGURE V- 3 : CINETIQUES D'EVOLUTION DE L'AIRES DES BANDES AMIDE II (LOSANGES) EN FONCTION DU TEMPS D'EXPOSITION DU BIOFILM DE REFERENCE A L'EAU DU RESEAU FILTREE ET DECHLOREE CONTENANT 3,4 (TRAITS BLEU) ; 2,8 (LOSANGE ROSE) ET 2,6MGCOD/L (TRIANGLES VERT).....	181
FIGURE V- 4 : SPECTRES DES TROIS BIOFILMS DE <i>P. FLUORESCENS</i> EXPOSES DURANT 3 H A DES EAUX DE RESEAU FILTRES ET DECHLOREES CONTENANT 2,6 (BRUN), 2,8 (ROUGE) ET 3,4 MGCOD/L (BLEU). 182	182
FIGURE V- 5 : EFFETS DES VARIATIONS DE LA QUANTITE DE COD PRESENTE ET/OU AJOUTEE DANS L'EAU DU RESEAU, EN FONCTION DU TEMPS, SUR L'EVOLUTION DU BIOFILM DE REFERENCE. APRES LA PERIODE D'INCUBATION D'UNE DUREE DE 3 H, LE BIOFILM A ETE SOUMIS A UN FLUX DE MILIEU STERILE LB (165 MGCOD/L) DURANT 3 H PUIS, A UNE SERIE D'ECHANTILLONS D'EAU DU RESEAU FILTREE ET DECHLOREE. LES QUANTITES DE COD (EN MG/L) SONT INDIQUEES POUR CHAQUE ECHANTILLON D'EAU. L'AIRES DE LA BANDE AMIDE II EST REPRESENTEE PAR LES MOTIFS PLEINS TANDIS QUE L'AIRES DE LA BANDE PS EST REPRESENTEE PAR LES MOTIFS CREUX. LES ETOILES INDICENT LES TEMPS AUXQUELS LES SPECTRES SERONT DISCUTES AU § II.2.	184
FIGURE V- 6 : AJUSTEMENT DES CINETIQUES DE LA BANDE AMIDE II LORSQUE LE BIOFILM EST EXPOSE A UNE EAU DU RESEAU ENRICHE EN COD (CONTENANT 11,8 MGCOD/L, ENTRE T = 126 H ET T = 142 H SUR LA CINETIQUE TOTALE FIGURE V- 5). L'EQUATION $A = A_1 * EXP(T/T1) + A_0$ CORRESPONDANT A UNE RECROISSANCE EXPONENTIELLE A ETE UTILISEE.	186
FIGURE V- 7 : ESSAI DE CORRELATION ENTRE LA VITESSE D'EVOLUTION DE L'AIRES DE LA BANDE AMIDE II ET LA CONCENTRATION EN COD PRESENTE / AJOUTEE DANS L'EAU DU RESEAU FILTREE ET DECHLOREE.....	188
FIGURE V- 8 : EVOLUTION DU PROFIL SPECTRAL DES BACTERIES ADHEREES EN FONCTION DU TEMPS D'EXPOSITION DU BIOFILM DE REFERENCE AUX ECHANTILLONS D'EAU DU RESEAU. LES SPECTRES ONT ETE NORMES PAR RAPPORT A LA BANDE AMIDE II.	191

CONCLUSION

Ce mémoire explore la possibilité d'évaluer *in situ* et en temps réel la qualité microbiologique d'une eau de distribution *via* la signature spectrale infrarouge en mode de réflexion totale atténuée d'un biofilm naissant monoespèce de *Pseudomonas fluorescens*.

La première étape de ce travail a consisté à obtenir et à interpréter les signatures spectrales infrarouge de *P. fluorescens* collectée à l'état planctonique dans différentes phases de croissance. L'étude fine des spectres a mis en évidence des changements dans le profil spectral en fonction de la phase de croissance qui peuvent être reliés aux changements physiologiques des cellules au cours de leur croissance. Non seulement le rapport des intensités des bandes attribuées respectivement aux protéines et aux polysaccharides diminue progressivement au cours de la croissance mais des modifications dans la structure secondaire des protéines sont également observables. Par ailleurs la comparaison des spectres IR obtenus respectivement en mode de transmission et en ATR a mis en lumière l'effet de l'hydratation sur les profils spectraux en particulier dans les régions associées aux protéines, aux acides nucléiques et aux polysaccharides. Cet effet nous a permis de confirmer certaines de nos attributions notamment dans la région spectrale associée aux polysaccharides qui est particulièrement complexe. Ces modifications en intensité en fonction du taux d'hydratation montrent par ailleurs combien il faut être prudent lorsqu'on normalise les spectres par rapport à la bande amide II. Certes, celle-ci se situe dans une région où il y a peu d'interférence spectrale d'où son utilisation comme marqueur de biomasse mais son intensité varie notablement en fonction du taux d'hydratation.

Cette connaissance des empreintes spectrales IR-ATR de *P. fluorescens* à l'état planctonique nous a alors permis dans un second temps de comprendre les premières étapes de la formation d'un biofilm de *P. fluorescens* sur un cristal ATR de germanium et de trouver les conditions opératoires optimales pour la formation du biofilm de référence. Nous avons ainsi montré que l'inoculation pendant 2 à 3 heures d'une suspension bactérienne de *P. fluorescens* en fin de phase exponentielle de croissance, au travers de la cellule ATR à circulation, conduit à un biofilm constitué d'une monocouche de bactéries. Ceci est confirmé à la fois par les cinétiques d'évolution des bandes infrarouge caractéristiques de *P. fluorescens* et par les images de microscopie optique et à épifluorescence. Le taux de recouvrement de la surface se situe aux alentours de $65\% \pm 15\%$. Les biofilms présentent une certaine hétérogénéité spatiale dans leur composition chimique comme l'ont révélée les analyses de microspectrométrie Raman. La présence ou non à la surface du cristal ATR d'un film conditionnant préalablement

au passage de la suspension bactérienne ne modifie pas sensiblement la cinétique de formation du biofilm.

Afin d'évaluer la faisabilité du système proposé, le biofilm ainsi formé a alors été exposé à des eaux contenant différentes quantités de Carbone Organique Dissous (COD) ajouté sous forme de LB. L'évolution temporelle de l'empreinte spectrale du biofilm montre clairement que ce dernier répond, en moins de 2h, à la variation de ce facteur clé de la recroissance bactérienne dans les eaux. Les modifications observées au niveau des intensités des bandes caractéristiques de *P. fluorescens* sont en accord avec les modèles de croissance et d'adhésion bactérienne ainsi qu'avec les mécanismes de surproduction de substances polymériques extracellulaires lors du développement du biofilm ou de détachement partiel du biofilm suite à une carence en nutriments.

Au terme de cette étude, il apparaît que les premiers résultats obtenus confortent l'idée à l'origine de ce travail à savoir détecter *in situ* et en temps réel les variations de la qualité microbiologique d'une eau de distribution *via* la signature spectrale IR-ATR d'un jeune biofilm de référence. Par rapport aux méthodes standard actuelles d'évaluation de la biostabilité d'une eau, un tel dispositif présenterait de nombreux avantages. Parmi ceux-ci les trois plus importants seraient : i) une évaluation *in situ* de la biostabilité ; ii) une capacité d'alerte précoce d'une éventuelle variation de la qualité microbiologique d'une eau (moins de deux heures) ; iii) et la possibilité de détecter tout facteur favorisant la recroissance ou le détachement du biofilm de référence même si ce facteur est en dessous des limites de détection des techniques conventionnelles. Ceci étant, de nombreuses autres études doivent désormais être réalisées pour confirmer ces premiers résultats et envisager réellement le développement d'un biocapteur qui pourrait être installé au sein même des canalisations d'un réseau de distribution. Il s'agira en particulier :

- d'étudier l'influence de la nature de la matière organique biodégradable sur la réponse du biofilm. En effet, la source du COD ajoutée dans l'eau de réseau afin de simuler des variations en COD, à savoir le milieu LB, contient une grande variété de nutriments et ne permet donc pas de savoir si le biofilm répond plus spécifiquement à tel ou tel nutriment ;
- d'évaluer l'effet d'autres paramètres tels que le pH, la température, la force ionique, la concentration en désinfectant mais aussi les conditions hydrodynamiques sur la réponse du biofilm de référence.

- d'envisager d'autres types de biofilm de référence monoespèce voire multiespèce, en faisant appel à d'autres souches bactériennes ;
- d'étudier de manière plus approfondie les signatures spectrales IR en ayant recours notamment aux méthodes statistiques de traitement du signal. L'exploitation des variations en intensité des bandes IR attribuées aux protéines et aux polysaccharides, comme cela a été effectué au cours de ce travail, est certes déjà riche en information, mais l'exploitation du profil dans son ensemble qui, comme on a pu l'observer peut changer fortement, devrait l'être encore davantage. Par ailleurs l'utilisation de telles méthodes permettrait une plus grande automatisation des résultats.
- et enfin de dépasser le stade du laboratoire en concevant un dispositif qui puisse être implanté au sein des canalisations. L'utilisation de fibres optiques transparentes dans le moyen infrarouge telles que les fibres en verre de chalcogénures est sans nul doute une piste intéressante.

Liste des publications et communications

Détails des communications orales (8CO), posters (5P) et publication (1)

- Dans le cadre du contrat européen SAFER (5 CO,1 P)

Kuopio, Finlande, avril 2004 :

« Bacteria biofilm monitoring by ATR-FTIR spectroscopy » **(CO)**

A.Delille, M.Dossot, H.Guilloteau, F.Quilès, F.Humbert

Nancy, France, 23 juin 2004 :

« Tools for biofilm monitoring: bacteria biofilm monitoring by ATR-FTIR spectroscopy»
(CO)

A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Paris, France, 28-29 octobre 2004 :

« Testing of interferent organic substances and response of the sensor to controlled BOC modification in water » **(CO)**

A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Paris, France, 10-11 février 2005 :

« Testing of interferent organic substances and response of the sensor to controlled BOC modification in water » **(CO)**

A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Southampton, Royaume Uni, 7 avril 2005 :

« In-situ monitoring of the response of *Pseudomonas fluorescens* to variations of BDOC in low nutritive water » **(CO)**

A.Delille, F.Humbert, F.Quilès

Nancy, France, 7 – 8 septembre 2006 :

« In situ and in real time monitoring of the drinking water biostability via the infrared spectral response of a nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm » (P)

A.Delille, F.Humbert, F.Quilès

- Lors de congrès nationaux et internationaux (1 CO, 4 P)

Nancy, France, 150 ans de la faculté des Sciences de Nancy, 26 novembre 2004 :

« Characterisation by ATR-FTIR of *Pseudomonas fluorescens* conditioning film on Ge and ZnSe crystals » (P)

A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Badajoz, Espagne, BioMicroWorld2005 'First International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology', 14-19 mars 2005 :

« Monitoring of the response of *Pseudomonas fluorescens* biofilm to variations of BDOC in low nutritive water by ATR-FTIR spectroscopy » (P)

A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Ramonchamp, France, Ecole Thématique CNRS 'Interface Microorganisme-Solution : de la cellule au biofilm', 9-13 mai 2005 :

« Monitoring of the response of *Pseudomonas fluorescens* biofilm to variations of BDOC by ATR-FTIR spectroscopy » (P) A.Delille, F.Quilès, F.Humbert

Nancy, France, Eurochem, 29 août – 1er septembre 2005 :

« Suivi in-situ par spectroscopie vibrationnelle de l'évolution d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* en fonction de la quantité de COD présente dans l'eau » (CO)

A.Delille, F.Humbert, F.Quilès

Orléans, France, Réseau National Biofilm, 14-15 juin 2006 :

« Utilisation des spectroscopies vibrationnelles en tant qu'outils de détection, de suivi et de caractérisation *in situ* de biofilms » **(P)**

F.Humbert, A.Delille, F.Quilès

- Lors de Séminaires de laboratoire (2 CO)

Présentation des travaux de thèse

- à l'équipe « Chimie et Spectrochimie des interfaces » (19 mai 2005) **(CO)**
- à l'équipe « Microbiologie » (10 mars 2006) **(CO)**

- Publication (1)

« *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 »

Anne Delille, Fabienne Quilès, and François Humbert

Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2007, Vol. 73, No. 18, p. 5782-5788.

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 Spectroscopy⁷

Anne Delille, Fabienne Quilès, and François Humbert*

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS,
405, rue de Vandœuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

Received 13 April 2007/Accepted 10 July 2007

Drinking water quality management requires early warning tools which enable water supply companies to detect quickly and to forecast degradation of the microbial quality of drinking water during its transport throughout distribution systems. This study evaluated the feasibility of assessing, in real time, drinking water biostability by monitoring in situ the evolution of the attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) fingerprint of a nascent reference biofilm exposed to water being tested. For this purpose, the responses of nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilms to variations in the dissolved organic carbon (DOC) level in tap water were monitored in situ and in real time by ATR-FTIR spectroscopy. Nascent *P. fluorescens* biofilms consisting of a monolayer of bacteria were formed on the germanium crystal of an ATR flowthrough cell by pumping bacterial suspensions in Luria-Bertani (LB) medium through the cell. Then they were exposed to a continuous flow of dechlorinated sterile tap water supplemented with appropriate amounts of sterile LB medium to obtain DOC concentrations ranging from 1.5 to 11.8 mg/liter. The time evolution of infrared bands related to proteins, polysaccharides, and nucleic acids clearly showed that changes in the DOC concentration resulted in changes in the nascent biofilm ATR-FTIR fingerprint within 2 h after exposure of the biofilm to the water being tested. The initial bacterial attachment, biofilm detachment, and regrowth kinetics determined from changes in the areas of bands associated with proteins and polysaccharides were directly dependent on the DOC level. Furthermore, they were consistent with bacterial adhesion or growth kinetic models and extracellular polymeric substance overproduction or starvation-dependent detachment mechanisms.

The biological stability of drinking water in distribution systems is a major concern of water supply companies (14), consumers, regulators, and public health authorities alike (1, 7). Bacterial regrowth within distribution systems is dependent upon a complex interaction of chemical, physical, operational, and engineering parameters (52). In particular, temperature, pH, disinfectant residual, hydrodynamic conditions, residence time, pipe materials, and above all the availability and composition of biodegradable organic matter are key factors in microorganism regrowth processes (37). Drinking water biostability is commonly assessed by biomass-based or biodegradability methods (37, 45, 47). Unfortunately, because of a slow response (usually more than 24 h) and/or batch processing these methods do not enable in situ real-time monitoring of microbiological quality. Moreover, culture-based methods do not reflect the actual dynamics of the attached bacterial films on pipe surfaces, which play a major role in postdisinfection biological regrowth (27, 33). Consequently, in addition to these methods, managing finished water quality requires early warning devices which enable workers to detect quickly, or even to forecast, degradation of drinking water quality. A possible strategy consists of monitoring continuously, in situ and in real

time, the status of biofilm development on the inner surfaces of the distribution system by using electrochemical (6, 20, 22), optical (18, 19), or piezoelectric (34) sensors. Nevertheless, to date, most of these sensors have been developed solely on a laboratory scale.

During the past two decades, attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy has proven to be a useful analytical tool for monitoring biofilms in situ nondestructively in real time and under fully hydrated conditions (11, 19, 35). Furthermore, Boualam et al. (10) showed that biofilm monitoring by the ATR-FTIR technique is able to discriminate within 10 h water samples containing variable quantities of biodegradable organic matter. This result suggests that drinking water biostability could be assessed by monitoring the evolution of the ATR-FTIR spectrum of an appropriate reference biofilm exposed to the water being tested. This paper explores and develops this idea. For this purpose, the responses of nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilms to variations in the dissolved organic carbon (DOC) in low-nutrient tap water were monitored by ATR-FTIR spectroscopy. *P. fluorescens* was chosen as the reference bacterium for several reasons: (i) it is present in drinking water distribution networks (46); (ii) it is able to grow in low-nutrient situations (50); (iii) it is used in a standard procedure used for measurement of assimilable organic carbon in water (4, 50); (iv) the *Pseudomonas* group is a good indicator of potential regrowth in water distribution systems (39); (v) and *P. fluorescens* has been widely used in model bacterial surface colonization studies (2, 15, 26, 36).

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, 405, rue de Vandœuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France. Phone: (33) 3 83 68 52 38. Fax: (33) 3 83 27 54 44. E-mail: francois.humbert@lcpme.cnrs-nancy.fr.

⁷ Published ahead of print on 20 July 2007.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and culture conditions. The nonpathogenic strain *P. fluorescens* CIP 69.13 used in this study was obtained from the Pasteur Institute Collection (Paris, France). Stock cultures were maintained with the Microbank cryovial system (Pro-lab Diagnostics, Cheshire, United Kingdom) at -80°C . Bacteria were cultivated for 24 h at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in Luria-Bertani (LB) broth (25 g/liter; Difco Laboratories, Detroit, MI) with continuous stirring. Bacterial suspensions were then diluted 1:10 in fresh LB medium (25 g/liter) and incubated in 500-ml Erlenmeyer flasks at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. All solutions were prepared using deionized water (Milli-Q; Millipore Corp.).

Preparation of bacterial inocula. When the cells reached the end of the exponential growth phase, they were harvested by centrifugation ($10,000 \times g$, 10 min, 4°C), and the pellet was resuspended in sterile LB medium (0.5 g/liter). The bacterial concentration of the resulting suspension was adjusted to obtain an optical density at 620 nm of 0.28, equivalent to $\sim 10^8$ CFU/ml. The suspension was left at room temperature ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) for 15 min on a magnetic stirrer before inoculation into the flow system.

Water samples. Water samples were taken from the drinking water distribution network of Villers-le-Nancy (France) and were left uncovered for 24 h to dechlorinate them. They were then supplemented with different amounts of LB medium to obtain various DOC concentrations ranging from 1.5 to 11.8 mg/liter. All water samples were filter sterilized through 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millipore Corp., Bedford, MA). The pH and ionic strength of solutions were 6.8 ± 0.1 and about 3 mM, respectively. The glassware used was heated at $550 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 4 h to remove any traces of carbon.

Bacterial enumeration procedures. Viable cell enumeration was done in triplicate on R2A agar (Merck, Darmstadt, Germany) by the spread plate technique. Counting was performed after incubation of plates at $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 h. The total cell number was determined by staining 1-ml portions of serial dilutions of the sample tested with 0.5 μl of SYBR green II (Molecular Probes, Eugene, OR) for 20 min in the dark. Then samples were vortexed for 1 min to disrupt any cell clumps, filtered through a 0.22- μm -pore-size Millipore polycarbonate membrane filter (Millipore Corp., Bedford, MA), and rinsed three times with nonpyrogenic sterile water (Aqua B, Braun, Melungen, Germany). Membranes supporting bacteria were mounted on a glass microscope slide. Bacteria were counted using an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) equipped with a $100\times$ (N.A. 1.30) oil immersion objective and an appropriate filter set (excitation wavelength, 488 nm; 500-nm long-pass dichroic mirror; 520- \pm 10-nm band-pass emission filter). Images were collected using a Color-view III charge-coupled device camera from Soft Imaging System. All experiments were performed in triplicate.

DOC measurement. DOC concentrations were measured with a total organic carbon (TOC) analyzer (model 5050A; Shimadzu, Melbourne, Australia) according to standard method 5310B (4). Inorganic carbon was eliminated with phosphoric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and by purified oxygen bubbling. Prior to each series of measurements, the TOC analyzer was calibrated with a potassium phthalate solution (Merck, Darmstadt, Germany). The detection limit was 0.1 mg/liter.

Flow system and ATR flow cell. The flow system used for growing biofilms and monitoring their evolution over time is shown in Fig. 1. It consisted of an inoculation flask that was placed onto the surface of a magnetic stirrer to provide constant mixing, an ATR-FTIR flow cell (SPECAC, Kent, United Kingdom), a peristaltic pump (Minipuls 3; Gilson, Villiers-le-Bel, France), and a waste reservoir, all connected by silicone tubing (inside diameter, 5 mm; Veralic). The ATR-FTIR flow cell was designed to enclose a trapezoidal crystal (72 by 10 by 6 mm) with an incidence angle of 45° , yielding six internal reflections on the upper face in contact with the sample. The ATR cell was sealed with Kalrez O-rings. Prior to each experiment, the flow cell was dismantled, cleaned with a 2% (vol/vol) Triton X-100 solution, and successively rinsed with hot tap water, ethanol, hot tap water again, and finally nonpyrogenic sterile water. Immediately after this cleaning process, the flow cell was reassembled and connected to the flow system by sterile silicone tubing. The whole flow system was then disinfected with 70% ethanol for 5 h and rinsed with nonpyrogenic sterile water for 24 h. The cleaning and disinfection procedure quality was controlled both by ATR-FTIR spectroscopy and by counting bacterial cells in water samples taken at the inlet and outlet of the flow system.

ATR-FTIR analysis. (i) Spectral acquisition. ATR-FTIR spectra were recorded between 4,000 and 800 cm^{-1} with a Vector 22 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a KBr beam splitter and a deuterated triglycine sulfate thermal detector. The resolution of the single-beam spectra was 4 cm^{-1} . The number of bidirectional double-sided interferogram scans was 100, which corresponded to a 1-min accumulation. All interferograms were Fourier

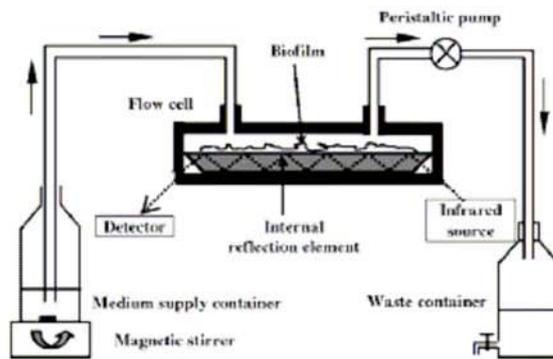


FIG. 1. Schematic diagram of the experimental setup used for growing *P. fluorescens* biofilms on the ATR crystal surface and monitoring changes in the biofilm ATR-FTIR fingerprint in real time.

processed using the Mertz phase correction mode and a Blackman-Harris three-term apodization function. FTIR measurements were performed at $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in an air-conditioned room and in the dark. The following appropriate spectra were used to remove the spectral background: an LB medium reference spectrum for the bacterial pellet spectrum and, for biofilm monitoring experiments, a sample reference spectrum acquired immediately before the step being studied. Water vapor subtraction and baseline correction were performed when necessary. Recording of spectra, data storage, and all manipulations were performed using the OPUS 3.1 software (Bruker, Karlsruhe, Germany). In the course of biofilm monitoring experiments, ATR-FTIR spectra were recorded every 10 or 30 min.

(ii) Sampling depth. In ATR-FTIR spectroscopy, the sample (the rare medium) is placed in contact with the ATR crystal (the dense medium), an internal reflection element (IRE) with a high refractive index (Fig. 1). The infrared beam is focused onto the edge of the IRE, multiply reflected on the inner surface of the ATR crystal, and then directed to a suitable detector. At each reflection at the sample-ATR crystal interface, an evanescent wave is created in the rare medium, where it can be absorbed. The electric field amplitude of this evanescent wave decays exponentially with distance from the crystal surface. The penetration depth (d_p) of the evanescent wave is defined as the distance at which the evanescent wave drops to e^{-1} times its intensity at the surface of the IRE. It is determined by the following equation: $d_p = \lambda / [2\pi (n_i^2 \sin^2 \theta - n_r^2)^{1/2}]$, where λ is the wavelength of the incident radiation, n_i is the refractive index of the IRE, n_r is the refractive index of the rare medium in contact with the IRE, and θ is the angle of incidence (21). For all experiments, a germanium IRE with a θ of 45° and an n_i of 4.0 was used. Considering the anomalous dispersion of water and the refraction index of bacterial components in the mid-infrared region (5, 38), the n_r of the rare medium was estimated to be around 1.43 ± 0.1 . Thus, the depths of penetration were calculated to be 0.22 ± 0.01 , 0.42 ± 0.01 , and $0.59 \pm 0.01 \mu\text{m}$ at 2,990, 1,550, and 1,100 cm^{-1} , respectively. Consequently, only bacteria that were immediately adjacent to the crystal surface were detected. The IRE surface area exposed to cell suspensions was approximately 8 by 48 mm.

Biofilm development on the IRE surface. Inoculation and introduction of a water sample into the flow system were carried out under sterile conditions, carefully avoiding formation of air bubbles in the flow cell. The flow rate was maintained at 0.7 ml/min.

(i) Initial attachment of bacteria. After cleaning and disinfection procedures, the flow cell was successively and aseptically supplied with (i) sterile LB medium (0.5 g/liter) for 24 h to establish a conditioning film on the IRE surface and to provide a background spectrum for the subsequent bacterial spectra and (ii) a bacterial suspension containing $\sim 10^8$ CFU/ml in sterile LB medium (0.5 g/liter) for 3 h to initiate attachment of *P. fluorescens* bacteria to the IRE. The inflow tubing of the ATR cell was then replaced by new sterile silicone tubing to avoid bacterial contamination of the subsequent water samples.

(ii) Influence of DOC level on the evolution of nascent *P. fluorescens* biofilms. Nascent biofilms were exposed to sterile LB medium (0.5 g/liter, corresponding to 165 mg DOC/liter) for 3 h to promote *P. fluorescens* biofilm development and/or to a series of dechlorinated and sterile water samples containing DOC at concentrations ranging from 1.5 to 11.8 mg/liter. Samples were pumped through the ATR cell at a rate of 0.7 ml/min for 15 to 50 h. When the solution was

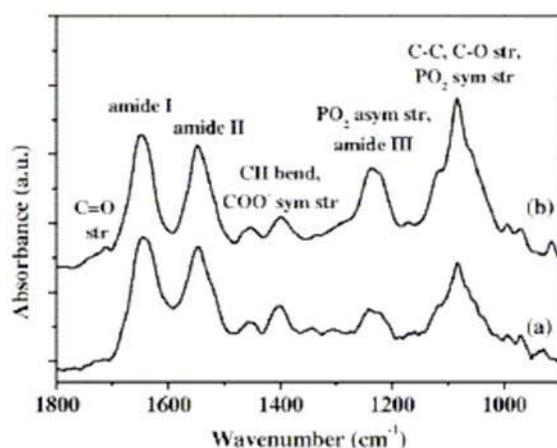


FIG. 2. ATR-FTIR spectra of *P. fluorescens* planktonic bacteria harvested at the end of the exponential phase (spectrum a) and a 6-h-old *P. fluorescens* biofilm formed by successive flow of a bacterial suspension for 3 h and sterile LB medium (0.5 g/liter) over the germanium IRE (spectrum b). The spectra have been vertically shifted for clarity and normalized to the amide II band. str., stretch; sym., symmetric; asym., asymmetric; a.u., arbitrary units.

changed, an air bubble was passed through the flow system under sterile conditions so that solutions did not mix as far as possible.

RESULTS AND DISCUSSION

ATR-FTIR fingerprint of planktonic and biofilm *P. fluorescens*. Figure 2 compares representative ATR-FTIR spectra of a pellet of planktonic *P. fluorescens* bacteria at the end of the exponential phase and a 6-h *P. fluorescens* biofilm formed on the germanium IRE. These spectra are typical of bacteria and have been assigned previously (17, 19). They exhibit major bands at around 3,400 cm^{-1} (O—H stretch), 3,300 cm^{-1} (N—H stretch), 2,900 cm^{-1} (C—H stretch) (data not shown), 1,648 cm^{-1} (amide I; mainly C=O stretch), 1,548 cm^{-1} (amide II; N—H bend and C—N stretch), 1,456 cm^{-1} (C—H bend), 1,400 cm^{-1} (partially due to a symmetric stretch of the carboxylate ions), 1,235 cm^{-1} (P=O asymmetric stretch, C—O—C stretch, and amide III [C—N bend and N—H stretch]), and the 1,150- to 900- cm^{-1} region, referred to below as the PS band (P=O symmetric stretch, C—C and C—O stretch). The main groups of biomolecules which can be associated with these bands are proteins (amide I, II, and III bands), nucleic acids (regions around 1,240 and 1,080 cm^{-1}), polysaccharides (region from 1,150 to 900 cm^{-1}), and lipids (region around 2,900 cm^{-1}). Interestingly, the band relative intensities in the two spectra were different, and in particular, the amide II/PS band intensity ratio was higher in the 6-h biofilm spectrum and this ratio varied with the age and the physiological state of biofilm, as discussed further below.

Initial attachment of *P. fluorescens* to the germanium ATR crystal. To initiate formation of a biofilm on the IRE, the flow cell was inoculated for 3 h with a suspension containing bacteria at the end of the exponential phase ($\sim 10^8$ CFU/ml) in sterile LB medium (0.5 g/liter). This 3-h period proved to be

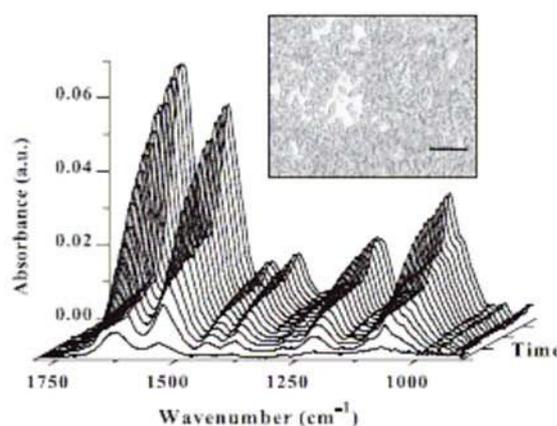


FIG. 3. Temporal evolution of ATR-FTIR spectra during initial attachment of *P. fluorescens* to the germanium IRE. A suspension containing bacteria at the end of the exponential phase ($\sim 10^8$ CFU/ml) in sterile LB medium (0.5 g/liter) was introduced into the flow cell at time zero and flowed through the cell for 3 h. The optical microscope image (magnification, $\times 100$) shows the nascent *P. fluorescens* biofilm attached to the Ge IRE after the 3-h inoculation period. Bar = 10 μm . a.u., arbitrary units.

relevant for forming nascent biofilms which resulted in ATR-FTIR spectra that had good signal-to-noise ratios but were far from saturation. The latter point was essential to detect under good conditions all subsequent spectral changes of a nascent biofilm in response to environmental parameter changes. ATR-FTIR spectra acquired over this period (Fig. 3) were similar to planktonic bacterium spectra (Fig. 2), in particular, regarding the relative intensities and the amide II/PS band intensity ratio. As illustrated in Fig. 4 for the amide II band, the intensity of all bands increased with time. These results reflected accumulation of biomass on the IRE surface and an increase in the IRE surface coverage by bacteria. Optical microscope images of 3-h biofilms showed *P. fluorescens* cells arranged mainly as a monolayer on the IRE surface (Fig. 3). The surface coverage of bacteria was $65\% \pm 15\%$. These results are in agreement with a previous study of Korber et al. (26) which reported that *P. fluorescens* bacteria obeyed monolayer attachment kinetics and the saturation of surfaces by a monolayer of colonizing bacteria does not equal the total available area during attachment of *P. fluorescens*. As observed previously in similar experiments with *Pseudomonas aeruginosa* (25), the rate of increase was reduced as the surface coverage increased. For this attachment period, the plot of the amide II band area (A) versus time can be fitted using the following equation: $A = A_{\text{max}}(1 - e^{-kt})$, where A_{max} is the amide II band area corresponding to a complete bacteria single layer, k is an absorption rate constant, and t is time (Fig. 4a). It should be noted that small changes in the culture conditions, growth phase, or number of bacteria inoculated into the flow system may slightly modify adhesion kinetics (54) and/or result in the appearance of a latency period before colonization (44). However, we observed that the differences in adhesion kinetics did not alter the subsequent response of the nascent biofilms to environmental condition changes.

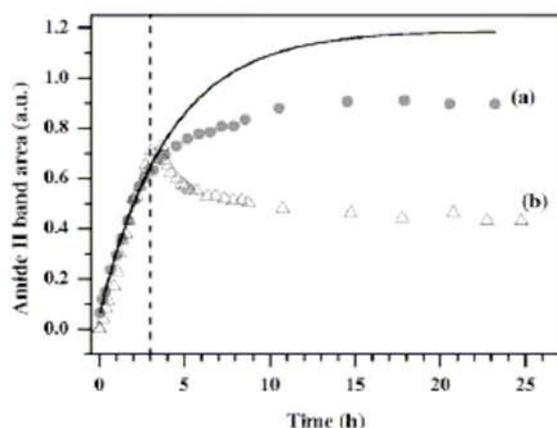


FIG. 4. Impact of the drastic reduction in the DOC level on development of nascent *P. fluorescens* biofilms attached to the Ge crystal. After 3 h of inoculation (dashed line), nascent biofilms were exposed to LB medium (165 mg DOC/liter) (experiment a) and dechlorinated sterile tap water (2.8 mg DOC/liter) (experiment b) under flow conditions. The solid line represents the nonlinear regression fit determined only for the data set for the 3-h inoculation period of experiment a using the equation $A = A_{\text{max}}(1 - e^{-kt})$ ($k = 0.24 \text{ h}^{-1}$; regression coefficient $R^2 = 0.997$). a.u., arbitrary units.

Nascent biofilm development under LB medium flow conditions. After 3 h of inoculation, only sterile LB medium was pumped through the system, with the pH and ionic strength constant. Although bacteria were no longer supplied, the intensity of all bands continued to increase, as shown in Fig. 4a for the amide II band. This increase reflected biofilm development and bacterial cells dividing on and colonizing the IRE surface (11) and producing extracellular polymeric substances (EPS) (16, 29). The overproduction of EPS by bacterial cells during attachment to an inert substratum is well documented (3, 12, 13, 41, 51). As previously reported (9, 16), the polysaccharide band increased at a higher rate than the amide I and amide II bands and the bands in the $1,240\text{-cm}^{-1}$ region. After LB medium flowed for about 15 h, the area of all bands reached a plateau. Unlike the findings of Bremer and Geesey (11), no sudden increase in the absorbance was observed when the bacterial inoculum was replaced with a sterile LB medium flow. This indicates that the absorbance increase over the 3-h inoculation period was due not only to bacterial deposition on the IRE surface but also partially to bacterial growth and EPS secretion. At the end of the inoculation period, the latter two mechanisms widely prevailed over deposition. Furthermore, it should be noted that passage of an air bubble through the flow cell between the bacterial and LB medium flows did not result in changes in the ATR-FTIR spectra, demonstrating that, unlike the findings of Suci et al. (43), the nascent biofilm was not altered significantly and the distance of attached bacteria from the IRE surface remained unchanged.

Nascent biofilm development under dechlorinated sterile drinking water flow conditions. As shown in Fig. 4b for the amide II band, development of a 3-h biofilm was quite different in tap water that was much less nutritive than 0.5-g/liter LB medium containing 165 mg DOC/liter, when all other param-

eters, including the temperature, pH, ionic strength, flow rate, and oxygen concentration, were identical in the two experiments. The intensity of all bands stopped increasing and declined rapidly within 1 h after the bacterial suspension was replaced with dechlorinated sterile drinking water containing 2.8 mg DOC/liter. Whereas steady absorbance was observed within 1 min after the pH or ionic strength was changed (30), the absorbance decreased continuously for about 20 h and then plateaued. This result is consistent with the suggestion that nascent biofilms of *P. fluorescens* partially detached in response to nutrient stress, as reported previously by Delaquis et al. (15). Allison et al. (2) suggested that the enzymatic degradation of EPS has a specific role in the detachment of *P. fluorescens* biofilms under starvation conditions. Moreover, as reported previously (23, 53), cells grown in rich nutrient-containing LB medium are more sensitive to transfer to low-nutrient medium.

Nascent biofilm response to variations in DOC level in tap water over a 12-day period. To confirm the previous findings and to explore the evolution of the nascent *P. fluorescens* biofilm response to variations in the DOC level over the course of time, a 3-h *P. fluorescens* biofilm was successively subjected to sterile LB medium and a series of sterile drinking water samples with DOC levels ranging from 1.5 to 11.8 mg/liter for durations of exposure between 15 and 50 h. As shown by the evolution of the amide II band area in Fig. 5, any variation in DOC level rapidly modified the kinetics of biofilm development. The response time was 1 to 2 h. For water samples containing DOC at a concentration less than about 5.3 mg/liter, the intensity of all bands continuously decreased in the first 15 to 20 h, reflecting, as shown previously (Fig. 4b), gradual detachment induced by starvation. Conversely, for water samples containing more than 5.3 mg DOC/liter, the intensity of all bands increased again, indicating that there was biofilm regrowth on the IRE surface. This biofilm regrowth is highlighted in Fig. 6 in the case of the water sample containing 11.8 mg DOC/liter. Over the course of this stage the amide II/PS band intensity ratio changed little and was similar to the ratio observed during the initial attachment period, suggesting that biofilm regrowth was mainly due to the growth of surface-attached bacteria. As shown in Fig. 6, the amide II band area increased exponentially with time, indicating that there was exponential lateral growth of bacteria still attached to the surface at this time. Assuming that the increase in the amide II band area was approximately proportional to the increase in the number of bacteria on the surface, the fit displayed in Fig. 6 yielded a specific growth rate of 0.36 h^{-1} , which was higher than the specific planktonic growth rate of 0.23 h^{-1} determined in suspension cultures. A shorter generation time in biofilms than in planktonic populations has been observed previously during early biofilm formation (8). Furthermore, this growth rate in biofilms is consistent with the growth rates reported by Mueller (32) for *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* biofilms on stainless steel. As clearly shown in Fig. 5, detachment and regrowth rates were dependent on the DOC level. In addition, the biofilm response was quite reproducible over the course of the experiment, and similar DOC levels resulted in qualitatively similar responses. However, it was difficult to establish an acute relationship between detachment and regrowth rates and the DOC level. This could have been due to

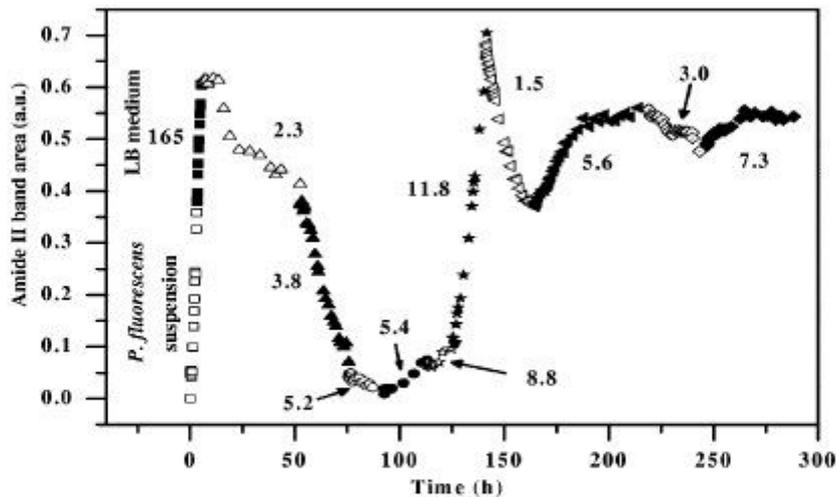


FIG. 5. Effect of DOC level changes on *P. fluorescens* biofilm development monitored by changes in the amide II band area. After the 3-h inoculation period (\square), the nascent biofilm attached to the Ge IRE was subjected to sterile LB medium for 3 h (\blacksquare) and then a series of dechlorinated sterile drinking water samples containing various DOC levels under flow conditions. The DOC level (in mg/liter) is indicated for each water sample. a.u., arbitrary units.

ageing of the reference biofilm and, in particular, changes in the physiological state of bacteria over the course of the experiment. Indeed, the physiological state of bacteria which regrew after starvation should have been different from that of the original bacteria which grew in the nutrient-rich LB medium. Previous studies demonstrated that a range of different bacteria display enhanced adhesion after starvation or after growth in low-nutrient medium (24) and that bacterial cells grown under low-nutrient conditions are physiologically more tolerant than bacterial cells isolated from higher-nutrient con-

ditions (23, 53). This also could explain why the response amplitude appeared to decrease over time and the spectral profile changed after 125 h, particularly in the PS region (data not shown).

Figure 5 might suggest that an in-line TOC or DOC analyzer could allow us to assess drinking water biostability. In fact, a number of studies have shown (40, 49) that TOC and DOC are inadequate for this purpose because the ratio of biodegradable or assimilable organic matter to TOC or DOC is highly variable. This is why the standard methods for assessing the biostability of drinking water rely upon the determination of biodegradable DOC and assimilable organic carbon (47). However, these methods also have limitations. They are batch methods which require several-day assays. Moreover, depending on the treatment, the standard organic carbon biodegradability measurements (assimilable organic carbon, biodegradable DOC, and DOC) can give contradictory results for the biostability of a given water sample (42). Indeed, many factors other than organic carbon can promote or limit microbial growth (28, 31, 47). In contrast, the method presented here does not have these limitations because it monitors directly and in situ the development of a nascent reference biofilm exposed to the water being tested. Unlike the biofilm formation rate method (48), no sampling is required. Therefore, any factor promoting significant regrowth or detachment of the nascent reference biofilm can be detected even if this factor is below the detection limits of conventional analytical techniques. Nonetheless, it is noteworthy that in this first feasibility study of such a biosensor, deterioration of drinking water microbiology quality was promoted by adding a few milligrams of LB broth per liter. LB complex broth provides numerous nutrients (amino acids, nucleic acids, a variety of trace carbohydrates, etc.) which can also be provided by most organic matter present in drinking water. The advantages of using LB broth in

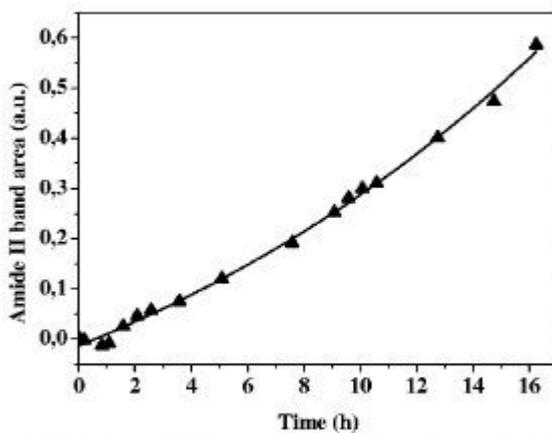


FIG. 6. Exponential fit of the amide II band area change with time when the nascent *P. fluorescens* biofilm was exposed to dechlorinated drinking water containing 11.8 mg DOC/liter, the eighth stage in Fig. 5. The time origin corresponds to the moment when the water sample was introduced into the flow cell. (regression coefficient $R^2 = 0.996$). a.u., arbitrary units.

this first study as a biodegradable organic matter supplement were that the amount of the supplemented assimilable organic matter was controlled and there was a large panel of nutrients. Yet, further investigations are now needed to determine to what extent the reported findings depend on the nature of the organic matter present in drinking water.

In conclusion, the results presented in this paper support the idea that in situ and in real time, drinking water biostability can be monitored via a biosensor based on the ATR-FTIR fingerprint of a nascent reference biofilm through a bypass system in order to avoid any contamination of the water being tested. In comparison with the established methods for assessing drinking water biostability, the major advantages of using such a biosensor should be (i) an early warning capacity (within 2 h), in particular because the reference biofilm is nascent, (ii) in situ assessment of drinking water biostability, and (iii) sensitive detection of any factor promoting biofilm growth, not only changes in the organic carbon concentration. However, further investigations are needed to confirm and extend the results of the present study and to consider implementation of such a biosensor in real drinking water systems. In particular, studies are currently being carried out in three main areas: (i) enhancement of biosensor sensitivity by optimizing reference biofilm formation, (ii) improvement of the correlation between nascent biofilm detachment or growth rate and the nature of the biodegradable organic matter, and (iii) evaluation of the effect of other parameters, such pH, temperature, disinfectant concentration, and hydrodynamic conditions, on the nascent reference biofilm response.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was undertaken as part of a research project which is supported by the European Commission within the Fifth Framework Programme "Energy, Environment and Sustainable Development" (no. EVK1-2002-00108).

The authors are solely responsible for this work, which does not represent the opinion of the European Community. The European Community is not responsible for any use that might be made of data appearing here.

We thank Hélène Guilloteau for technical assistance.

REFERENCES

- Allan, J. J., B. Vrana, R. Greenwood, G. A. Mills, B. Roig, and C. Gonzalez. 2006. A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69:302-322.
- Allison, D. G., B. Ruiz, C. Sanjose, A. Jaspe, and P. Gilbert. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167:179-184.
- Allison, D. G., and I. W. Sutherland. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133:1319-1327.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Association, Washington, DC.
- Arakawa, E., T. P. S. Tuminello, B. N. Khare, and M. E. Milham. 1997. Optical properties of horseradish peroxidase from 0.13 to 2.5 μm . *Biospectroscopy* 3:72-80.
- Auret, L., and J. Desmarest. 2005. Un concept innovant en matière de qualité de l'eau: le capteur de détection biofilm. *Eau Ind. Nucl.* 283:61-63.
- Bartram, J., J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, and A. Glasbacher (ed.). 2003. Heterotrophic plate counts in drinking-water safety. IWA Publishing, London, United Kingdom.
- Bester, E., G. Wolfardt, L. Joubert, K. Garny, and S. Saftic. 2005. Planktonic-cell yield of a pseudomonad biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7792-7798.
- Bosch, A., D. Serra, C. Pietro, J. Schmitt, D. Naumann, and O. Yantorno. 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:736-747.
- Boualam, M., F. Quilès, L. Mathien, and J. C. Block. 2002. Monitoring the effect of organic matter on biofilm growth in low nutritive waters by ATR/FT-IR spectroscopy. *Biofouling* 18:73-81.
- Bremer, P. J., and G. G. Geesey. 1991. An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling* 3:89-100.
- Cheung, H. Y., S. Q. Sun, B. Sreedhar, W. M. Chang, and P. A. Tanner. 2000. Alterations in extracellular substances during the biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* on aluminum plates. *J. Appl. Microbiol.* 89:100-106.
- Costerton, J. W. 1985. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Dev. Ind. Microbiol.* 26:249-261.
- Delahaye, E., Y. Levi, G. Leblon, and A. Montiel. 2006. A simple system for biofilm potential monitoring in drinking water. *J. Basic Microbiol.* 46:22-27.
- Delaquis, P. J., D. E. Caldwell, J. R. Lawrence, and A. R. McCurdy. 1989. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microb. Ecol.* 18:199-210.
- Doulan, R. M., J. A. Piele, C. D. Heyes, L. Sanii, R. Murga, P. Edmonds, I. El-Sayed, and M. A. El-Sayed. 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4980-4988.
- Filip, Z., and S. Hermann. 2001. An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *Eur. J. Soil Biol.* 37:137-143.
- Flemming, H. C., and A. Tarnackiarov. 2003. Monitoring of biofilms in technical systems—a crucial component of advanced anti-fouling strategies. *Water Sci. Technol. Water Supply* 3:199-204.
- Geesey, G. G., and P. A. Suci. 2000. Monitoring biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy, p. 253-277. In J. V. Evans (ed.), *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Gão, M. S., M. I. Montenegro, and M. J. Vieira. 2003. Monitoring biofilm formation by using cyclic voltammetry—effect of the experimental conditions on biofilm removal and activity. *Water Sci. Technol.* 47:51-56.
- Harrick, N. J. 1985. Internal reflection spectroscopy. Harrick Scientific Corporation, Ossining, NY.
- Herbert-Guillou, D., B. Tribollet, D. Festy, and L. Kiéné. 1999. In situ detection and characterization of biofilm in water by electrochemical methods. *Electrochim. Acta* 45:1067-1075.
- Horowitz, A., M. I. Krichevsky, and R. M. Atlas. 1983. Characteristics and diversity of subarctic marine oligotrophic, stenoheterotrophic, and euryheterotrophic bacterial populations. *Can. J. Microbiol.* 29:527-535.
- James, G. A., D. R. Korber, D. E. Caldwell, and J. W. Costerton. 1995. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* 177:907-915.
- Kang, S. Y., P. J. Bremer, K. W. Kim, and A. J. McQuillan. 2006. Monitoring metal ion binding in single-layer *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using ATR-IR spectroscopy. *Langmuir* 22:286-291.
- Korber, D. R., J. R. Lawrence, and D. E. Caldwell. 1994. Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1421-1429.
- Lechevallier, M. W., W. Schultz, and R. G. Lee. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:857-862.
- Lehtola, J. M., I. T. Miettinen, T. Vartiainen, and P. J. Martikainen. 2002. Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. *Water Res.* 36:3681-3690.
- Marotte, L., G. Kegelaer, C. Sandt, J. Barbeau, and M. Lafleur. 2007. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Anal. Biochem.* 361:7-14.
- McWhirter, M. J., P. J. Bremer, and A. J. McQuillan. 2002. Direct infrared spectroscopic evidence of pH- and ionic strength-induced changes in distance of attached *Pseudomonas aeruginosa* from ZnSe surfaces. *Langmuir* 18:1904-1907.
- Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. J. Martikainen. 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3242-3245.
- Mueller, R. F. 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Res.* 30:2681-2690.
- Ndiogme, S., P. M. Huck, and R. M. Slawson. 2005. Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system. *Water Res.* 39:953-964.
- Nivens, D. E., J. Q. Chambers, T. R. Anderson, and D. C. White. 1993. Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 65:85-89.
- Nivens, D. E., J. Schmitt, J. Sniatecki, T. Anderson, J. Q. Chambers, and D. C. White. 1993. Multichannel ATR/FT-IR spectrometer for on-line examination of microbial biofilms. *Appl. Spectrosc.* 47:668-671.
- O'Toole, G. A., and R. Keltner. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449-461.
- Prevost, M., P. Laurent, P. Servais, and J. C. Joret (ed.). 2005. Biodegrad-

- able organic matter in drinking water treatment and distribution. AWWA, Denver, CO.
38. Reiter, G., M. Siam, D. Kalkenhagen, W. Gollneritsch, D. Baurecht, and U. P. Fringeli. 2002. Interaction of a bacterial endotoxin with different surfaces investigated by in situ Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Langmuir* 18:5761-5771.
 39. Ribas, F., J. Perramon, A. Terradillos, J. Frias, and F. Lucena. 2000. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *J. Appl. Microbiol.* 88:704-710.
 40. Rizet, M., F. Fiesinger, and N. Honel. 1982. Bacterial regrowth in a distribution system and its relationship with the quality of the feed water: case studies, p. 1199-1214. In *Proceedings of the AWWA Water Quality Technology Conference*, Miami Beach, AWWA, Denver, CO.
 41. Sauer, K., and A. K. Camper. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183:6579-6589.
 42. Sharp, R. R., A. K. Camper, J. J. Crippen, O. D. Schneider, and S. Leggiere. 2001. Evaluation of drinking water biostability using biofilm methods. *J. Environ. Eng.* 127:403-410.
 43. Suci, P. A., K. J. Stedlecki, R. J. J. Palmer, D. C. White, and G. C. Geesey. 1997. Combined light microscopy and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4600-4603.
 44. Suci, P. A., J. D. Vraný, and M. W. Mittelman. 1998. Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials* 19:327-339.
 45. Taze, S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Res.* 33:3545-3556.
 46. Van der Kooij, D. 1977. The occurrence of *Pseudomonas* spp. in surface water and in tap water as determined on citrate media. *Antonie Leeuwenhoek* 43:187-197.
 47. Van der Kooij, D. 2003. Managing regrowth in drinking-water distribution systems, p. 199-232. In J. Bartram, J. Cortivo, M. Exner, C. Fricker, and A. Glasmacher (ed.), *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
 48. Van der Kooij, D., H. R. Veenendaal, C. Baars-Lorist, D. W. van der Klift, and Y. C. Drost. 1995. Biofilm formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water. *Water Res.* 29:1655-1662.
 49. Van der Kooij, D., A. Visser, and W. A. M. Hijnen. 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 74:540-545.
 50. Van der Kooij, D., A. Visser, and J. P. Oranje. 1982. Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentrations in tap water. *Antonie Leeuwenhoek* 48:229-243.
 51. Vandevivere, P., and D. L. Kirchman. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3280-3286.
 52. Volk, C. J., and M. W. Lechevallier. 1999. Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4957-4966.
 53. Walker, S. L. 2005. The role of nutrient presence on the adhesion kinetics of *Bacillus cereus* G4g and ENV435g. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 45:181-188.
 54. Walker, S. L., J. E. Hill, J. A. Redman, and M. Elimelech. 2005. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3092-3099.

