



**HAL**  
open science

# Influence de stress environnementaux sur les propriétés physicochimiques de jeunes biofilms en cours de formation : étude par spectroscopies vibrationnelles infrarouge-Raman et de force AFM

Dima Jamal

► **To cite this version:**

Dima Jamal. Influence de stress environnementaux sur les propriétés physicochimiques de jeunes biofilms en cours de formation : étude par spectroscopies vibrationnelles infrarouge-Raman et de force AFM. Autre. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0075 . tel-01751714

**HAL Id: tel-01751714**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751714v1>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**Thèse**  
présentée pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université de Lorraine**  
en Chimie  
par

**Dima JAMAL**

---

**Influence de stress environnementaux sur les propriétés physico-chimiques de jeunes biofilms en cours de formation : Etude par spectroscopies vibrationnelles infrarouge-Raman et de force AFM**

---

Soutenue publiquement le 17 juin 2015 à l'Université de Lorraine, Nancy, France  
devant la commission d'examen

Président du jury

M. P. DI MARTINO      Professeur, Université de Cergy Pontoise - ERRMECe, Cergy-Pontoise

Rapporteurs

M. G. LOUARN      Professeur, Université de Nantes - IMN, Nantes  
M. C. MARLIERE      Directeur de Recherche, CNRS, ISMO, Orsay

Examineurs

M. G. FRANCIUS      Chargé de recherche, CNRS - LCPME, Villers-lès-Nancy  
M. F. HUMBERT      Professeur, Université de Lorraine - LCPME, Villers-lès-Nancy  
Mme F. QUILES      Chargée de recherche, CNRS - LCPME, Villers-lès-Nancy

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

§ وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا §

Et on ne vous a donné que peu de connaissance

سورة الإِراء : 58

*A mes parents*

*A Noor...*

*A Rima, Rana, Wissam, Hicham, Dania et Imad*



## Remerciements

*Mon travail de thèse s'est déroulé au sein du laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'environnement au sein de l'équipe de Chimie des surfaces et des interfaces, je remercie Pr. Alain Walcarius, directeur du laboratoire et Pr. Christian Ruby, directeur de l'équipe CSI pour m'avoir accueilli durant ces quatre dernières années.*

*J'adresse mes remerciements à Dr. Fabienne Quilès, Dr. Grégory Francius et Pr. François Humbert pour m'avoir encadrée durant mes travaux de thèse et m'avoir apportée leurs connaissances, mais aussi pour leur aide dans la rédaction de ce rapport. C'était un grand honneur de travailler avec vous.*

*Je remercie les membres de jury Pr. Guy Louarn, Pr. Christian Marlière, Pr. Patrick Di Martino et Dr. Fabienne Quilès qui me font l'honneur de juger mes travaux de recherche.*

*Mes remerciements à l'ensemble du laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'environnement.*

*Un grand merci à mes meilleurs amis Souhir Saadi, Wissam Ghach, Carine Assaker, Khaoula Hamdi et Mouna Lazrag.*

إلى أمي و أبي، لي سنده من كل ما انت تضرر بطنه لي لكم واعترازي ببالثقاقتي فيضام وهالي على مدد لسنوات لا خمس  
الطيري فلق دكيت ملي نطام اخي بسند و لولا دعمكم المتواصل لي لمت لثقت من الوصول إلى هنا. لى عماد، هشام ووسام،  
لثقتم وسبقون من لاج الاله هجيت شتند الأمور بلك الأحاديث الأخرى من لاطي لطلما أعادت الأمور لي نصيلا لكل ما رطيت  
كل شي هيتداعى.

*To Rima, Rana and Dania, You were always there for me to push me forward, this would have not been possible without your constant support.*

*To Noor, thank you for being there whenever I needed you, the past couple of months would have been much more difficult if it wasn't for you ...*



## Résumé

Les biofilms sont des communautés complexes de microorganismes, enchâssées dans une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires ou EPS. Les biofilms se forment à la surface de la plupart des matériaux, qu'ils soient de nature biologique ou non, et sont à l'origine de divers problèmes économiques et sanitaires. Les bactéries dans un biofilm, dites bactéries sessiles, présentent en effet des propriétés phénotypiques qui les distinguent de leurs homologues planctoniques, notamment par une résistance accrue aux antibiotiques et aux traitements de désinfection. D'où, la nécessité de prévenir leur formation et/ ou de leur élimination à partir de stratégies mieux adaptées à ce mode de vie en communauté. Le développement de telles stratégies passe entre autre par une meilleure connaissance des contributions physico-chimiques gouvernant les interactions de ces microorganismes avec leur environnement proche notamment lors des étapes initiales de la formation des biofilms.

Deux grands objectifs ont été fixés au début de cette thèse, le premier visant à caractériser, *in situ* et en temps réel la formation de jeunes biofilms de deux modèles bactériens : une souche naturelle et ubiquitaire de *Pseudomonas fluorescens* et une souche modèle d'*Escherichia coli* obtenue par génie génétique pour surexprimer un seul type d'EPS. Le deuxième objectif de cette thèse, consiste à étudier leurs réponses à un stress environnemental ou chimique, notamment quand les biofilms doivent se développer dans des conditions extrêmes de pH. Pour atteindre ces objectifs, différentes techniques ont été combinées pour étudier de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire le développement des biofilms.

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR) a été utilisée pour suivre en temps réel le développement des biofilms. Nous avons pu suivre l'évolution des empreintes spectrales IR-ATR au cours de la formation des biofilms, sous des conditions favorables ou non à leur croissance. De jeunes biofilms de 24 h ont été étudiés par microspectroscopie Raman confocale (MRC), celle ci permettant d'obtenir des informations localisées sur la composition chimique des biofilms. La structure générale des biofilms a été visualisée par la microscopie à épifluorescence. Finalement, les propriétés physico-chimiques des EPS ont été quantifiées par spectroscopie de force atomique à l'échelle de la molécule unique (SMFS pour Single Molecule Force Spectroscopy).

Mots clés : Biofilms, EPS, stress environnemental, FTIR-ATR, microspectroscopie Raman confocale, AFM, SMFS



## Abstract

Biofilms are complex communities of microorganisms, embedded in an auto-produced matrix of extracellular polymeric substances or EPS. Biofilms form on the surface of most materials, whether or not they are of biological nature, and cause major economic problems as well as public health concerns. Bacteria within a biofilm also called sessile bacteria, have phenotypic characteristics that distinguish them from their planktonic counterparts, rendering them more resistant to antibiotics and to disinfection strategies. Hence, the prevention of their formation and/ or their elimination requires the use of strategies that are well suited to the sessile mode of life. The development of these strategies begins with a better understanding of the physicochemical contributions that govern the interaction between the sessile community and its environment especially during the first steps of biofilm formation.

Two main objectives were defined at the beginning of this thesis, the first was to characterize, *in situ*, and in real time the development of nascent biofilms. Two bacterial models were studied: a natural and ubiquitous strain of *Pseudomonas fluorescens* and a model strain of *Escherichia coli* genetically modified to overexpress one type of EPS. The second objective was to study their responses towards an environmental or chemical stress; particularly how their development would be affected under extreme conditions of pH. To gain these objectives, different techniques were combined to study from the molecular to the cellular scale the development of biofilms.

Fourier Transform Infrared spectroscopy in attenuated total reflection mode was used to evaluate in real time the development of biofilms. We were able to detect changes in the IR-ATR spectral profile along biofilm formation under favorable and non favorable growth conditions. 24 h - old biofilms were characterized using confocal Raman microspectroscopy, which allowed us to gather localized information on their chemical composition. The structure of biofilms was visualized using epifluorescence microscopy. Finally, physicochemical properties of EPS were quantified using single molecule force spectroscopy.

Keywords: biofilms, EPS, environmental stress, FTIR-ATR, confocal Raman microspectroscopy, AFM, SMFS.

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Abstract .....	6
<b>Table des matières</b> .....	<b>7</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>12</b>
<b>Table des tableaux</b> .....	<b>22</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>23</b>
Introduction générale.....	25
Chapitre I Revue bibliographique .....	27
1. Les biofilms bactériens.....	29
1.1. Qu'est-ce qu'un biofilm ? .....	29
1.2. Etapes de formation d'un biofilm bactérien .....	31
1.3. Matrice extracellulaire.....	34
1.3.1. Composition de la matrice extracellulaire .....	34
1.3.2. Fonctions de la matrice extracellulaire .....	35
1.3.3. Paroi bactérienne et structures de surface .....	36
1.4. Réponse des biofilms aux stress environnementaux .....	38
1.5. Stratégies de régulation des biofilms .....	40
2. Les modèles bactériens.....	41
2.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	42
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	42
3. Outils d'exploration des biofilms .....	43
3.1. Etude de la composition chimique de la matrice extracellulaire.....	44
3.2. Exploration de la structure des biofilms.....	44
3.3. Application des spectroscopies vibrationnelles à l'étude des biofilms bactériens ....	46
3.3.1. La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (FTIR-ATR).....	46

3.3.2. La Microspectroscopie Raman Confocale .....	48
3.4. Application de la microscopie à force atomique pour l'étude des biofilms bactériens .....	49
3.4.1. Introduction.....	49
3.4.2. Imagerie des biofilms bactériens .....	50
3.4.3. Caractérisation des biofilms par mesures de force AFM .....	51
Chapitre II Matériels et Méthodes.....	55
1. Matériel .....	57
1.1. Souches bactériennes.....	57
1.2. Milieux .....	58
1.2. 1. Milieux de conservation .....	58
1.2. 2. Milieux de culture.....	58
1.3. Produits chimiques .....	58
1.3.1. Antibiotiques .....	60
1.3.2. Lectines.....	60
1.3.3. Fluorochromes .....	60
2. Culture des souches bactériennes .....	61
2.1. Cultures des bactéries sous forme planctonique .....	61
2.1.1. Conditions de culture pour <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	61
2.1.2. Conditions de culture pour <i>Escherichia coli</i> .....	61
2.1.3. Préparation des échantillons bactériens pour analyse .....	62
2.2. Formation des biofilms.....	62
2.2.1. Dispositif expérimental .....	62
2.2.2. Biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	66
2.2.3. Biofilms d' <i>Escherichia coli</i> .....	66
3. Spectroscopies optiques .....	67
3.1. Interaction rayonnement-matière .....	67
3.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée .....	70
3.3. Microspectroscopie Raman Confocale (MRC).....	74
3.4. Spectrométrie d'absorption dans l'UV-Visible.....	76

3.5. Microscopie à épifluorescence .....	77
4. Microscopie à force atomique .....	78
4.1. Principe.....	78
4.2. Spectroscopie de Force.....	81
4.2.1. Mesures de force.....	81
4.2.2. Spectroscopie de force à molécule unique (Single molecule force spectroscopy, SMFS) .....	82
4.2.3. Fonctionnalisation des sondes .....	83
4.2.4. Modèles physiques décrivant le comportement mécanique de polymères sous étirement.....	85
4.3. Préparation des échantillons.....	87
4.4. Acquisition et traitement des données.....	88
Chapitre III Etude des signatures Raman de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Escherichia coli</i> à l'état planctonique .....	89
1. Signature Raman de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et d' <i>Escherichia coli</i> sous forme planctonique .....	91
2. Variation de la signature Raman des bactéries <i>P. fluorescens</i> planctoniques en fonction de la longueur d'onde d'excitation.....	99
2.1. Attribution des bandes intenses dans les signatures bactériennes de <i>P fluorescens</i> à 514 et 530 nm.....	100
2.2. Confirmation de la signature du cytochrome <i>c</i> par Raman polarisé .....	105
3. Signature spectrale Raman des bactéries <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>E. coli</i> en fonction de leur phase de croissance .....	107
3.1. Courbes de croissance .....	107
3.2. Spectres Raman à différents stades de croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ..	109
Chapitre IV Caractérisation <i>in situ</i> de jeunes biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et d' <i>Escherichia coli</i> sous conditions de croissance non stressantes .....	117
1. Biofilm de 24h de <i>Pseudomonas fluorescens</i> à pH 7 .....	119
1.1. Suivi <i>in situ</i> des premières étapes de formation d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> par spectroscopie infrarouge en mode réflexion totale atténuée (IR-ATR) .....	119

1.1.1. Signature IR d'un culot bactérien de <i>P. fluorescens planctoniques</i> .....	119
1.1.2. Suivi <i>in situ</i> des 24 premières heures de la formation d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> ..	121
1.1.3. Nature des polysaccharides extra et intra-cellulaires produits .....	126
1.2. Signature Raman de jeunes biofilms de 24h de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	128
1.2.1. Effet de la longueur d'onde d'excitation sur la signature spectrale Raman des biofilms de <i>P. fluorescens</i> .....	128
1.2.2. Effet de l'hydratation sur la signature Raman des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	130
1.2.3. Comparaison des signatures Raman des bactéries planctoniques et sessiles .....	132
1.3. Etude <i>in situ</i> par SMFS des propriétés conformationnelles des EPS produites par un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> formé dans des conditions standard de croissance ...	135
2. Biofilm de 24h d' <i>Escherichia coli</i> à pH 7 .....	145
2.1. Signature IR des culots bactériens d' <i>E. coli</i> planctoniques aux différentes phases de croissance .....	145
2.2. Suivi <i>in situ</i> par IR-ATR de 24 premières heures de la formation d'un jeune biofilm d' <i>Escherichia coli</i> .....	146
2.3. Signature Raman des biofilms d' <i>Escherichia coli</i> de 24 h .....	154
2.4. Etude <i>in situ</i> par SMFS des propriétés conformationnelles des EPS produites par un biofilm de 24 h d' <i>Escherichia coli</i> formé dans des conditions standard de croissance .	157
Chapitre V Influence d'un stress acide sur la formation des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Escherichia coli</i> .....	163
1. Etude de la formation d'un jeune biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i> dans un milieu acide .....	165
1.1. Suivi <i>in situ</i> du développement d'un biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sous condition de stress acide.....	165
1.2. Caractérisation vibrationnelle (infrarouge et Raman) du biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé sous condition acide.....	172
1.3. Etude par SMFS des propriétés conformationnelles des exopolymères d'un biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i> de 24 h formé à pH 3.....	176
2. Effet d'un stress acide sur la formation d'un jeune biofilm d' <i>Escherichia coli</i> .....	184

2.1. Suivi <i>in situ</i> et en temps réel par FTIR-ATR du développement d'un biofilm d' <i>Escherichia coli</i> en milieu LB/10 acide pH 3 .....	184
2.2. Etude par SMFS de l'effet du développement sous condition acide de croissance sur les propriétés conformationnelles des exopolymères d'un biofilm d' <i>Escherichia coli</i> de 24 h.....	192
3. Discussion .....	198
Conclusion.....	201
Références bibliographiques .....	207
Résumé .....	225
Abstract .....	225

## Table des illustrations

Figure I.1 : Nombre de publications sur les biofilms par année, moteur de recherche : Web of Science, mot clé : biofilms .....	29
Figure I.2 : Etapes de formation d'un biofilm : (1) adhésion réversible à la surface du substrat, (2) adhésion irréversible accompagnée de la production des EPS et la formation de microcolonies, (3) maturation du biofilm et (4) dispersion. (EPS : substances polymériques extracellulaires), source : Ebcrc.com.au.....	32
Figure I.3 : Structure de la paroi bactérienne Gram négatif (NAG : N-acétyl glucosamine, NAM : acide N-acétyl muramique).....	36
Figure I.4 : structure de la poly $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine.....	43
Figure II.1 : Supports utilisés pour la formation des biofilms : (a) cristal ATR en germanium, (b) disque en germanium.....	63
Figure II.2 : photos montrant l'assemblage et les dimensions de cellules d'écoulement utilisées pour la formation des biofilms destinés aux analyses (A) <i>in situ</i> et en temps réel en spectroscopie FTIR-ATR et (B) aux analyses par spectroscopie Raman et AFM, la hauteur indiquée correspond à la hauteur de la chambre d'écoulement. ....	64
Figure II.3 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la formation des biofilms.....	65
Figure II.4 : Diagramme de Jablonski.....	67
Figure II.5 : Formation d'une onde évanescente à l'interface cristal / échantillon .....	71
Figure II.6 : Schéma de l'accessoire ATR diamant .....	72
Figure II.7 : Descriptif d'un microspectromètre Raman confocal .....	74
Figure II.8 : Schéma d'une puce de soutien de cantilevers à sondes pyramidales (modèle MLCT-AUNM, Bruker AXS Nano) .....	78
Figure II.9 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique .....	79
Figure II.10 : Zones d'opération des différents modes d'imagerie en AFM.....	80
Figure II.11 : Représentation schématique d'une courbe de force, courbe d'approche en rouge, courbe de retrait en bleu .....	81
Figure II.12 : Principe de la microscopie de force atomique à molécule unique : l'interaction entre la sonde et l'échantillon se fait d'une manière spécifique entre les molécules immobilisées sur la sonde et leurs molécules cibles à la surface de l'échantillon, exemple de lectine greffée sur la sonde entrant en interaction avec un exopolymère bactérien.....	83
Figure II.13 : Les différentes étapes du protocole de fonctionnalisation des sondes, modifié à partir de Francius <i>et al.</i> 2006.....	84

Figure II.14 : a : exemple d'une courbe de force expérimentale enregistrée en utilisant une sonde fonctionnalisée avec une lectine réalisée sur un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h, b : zoom sur une zone d'intérêt .....	85
Figure II.15 : Représentation schématique de polymères décrits par (a) le modèle FJC et (b) le modèle WLC .....	86
Figure II.16 : (A) : microscope à force atomique avec l'échantillon placé en dessous, (B) : disque de germanium fixé sur une lame de verre, les deux placés dans la porte-échantillon pour les analyses AFM.....	87
Figure III.1 : Spectres Raman de deux supports en germanium enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) respectivement de 514 (réseau à 1200 traits) et 530 nm (réseau à 1800 traits). Les spectres sont normés par rapport à la bande à $302\text{ cm}^{-1}$ . Encart : agrandissement des bandes de faible intensité .....	92
Figure III.2 : Spectres Raman de culots partiellement hydratés de bactéries <i>P. fluorescens</i> (en haut) et <i>E. coli</i> (en bas) planctoniques collectées en phase exponentielle, les spectres sont normés par rapport à la bande à $1003\text{ cm}^{-1}$ de la phénylalanine, $\lambda_{ex}$ : 488nm, (C : cytosine, A : adénine, U : uracile, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, AN : acides nucléiques, $\nu$ : vibration d'élongation, $\delta$ : vibration de déformation), réseau à 1200 traits. ....	93
Figure III.3 : Signatures spectrales Raman d'un culot de bactéries <i>P. fluorescens</i> planctoniques aux longueurs d'onde d'excitation 488, 514 (réseau à 1200 traits) et 530 nm (réseau à 600 traits). Les bactéries ont été collectées en phase exponentielle et les spectres sont normés par rapport au pic à $1003\text{ cm}^{-1}$ attribué à la phénylalanine.....	99
Figure III.4 : Spectres Raman du cytochrome <i>c</i> bovin et d'un culot de bactéries <i>P. fluorescens</i> planctoniques en phase exponentielle, $\lambda_{ex}$ : 514 (vert), 530 (rouge), réseau à 1800 traits (sauf pour le spectre du cytochrome <i>c</i> , $\lambda_{ex}$ 514 nm, réseau à 1200 traits), * : sel présent dans le solvant .....	101
Figure III.5 : Structure de l'hème du cytochrome <i>c</i> (extrait à partir de Hu <i>et al.</i> [266]) .....	102
Figure III.6 : spectres UV-Visible du cytochrome <i>c</i> bovin sous forme réduite .....	102
Figure III.7 : Spectres Raman du cytochrome <i>c</i> (forme réduite) de cœur de bœuf obtenus respectivement à 514 (en haut, réseau à 1200 traits) et 530 nm (en bas, réseau à 1800 traits) .....	103
Figure III.8 : Spectres Raman d'un culot partiellement hydraté de bactéries <i>E. coli</i> planctoniques collectées en phase exponentielle, $\lambda_{ex}$ : 488 (rouge, en bas, réseau à 1800 traits), 514 (noir, au milieu, réseau à 1200 traits) et 530 nm (vert, en haut, réseau à 1800 traits). Les	



spectres sont normés par rapport à la bande de phénylalanine à $1003\text{ cm}^{-1}$ , $\Delta$ : vibration de l' $\text{O}_2$ .....	104
Figure III.9 : Région des vibrations CH des spectres Raman de cytochrome <i>c</i> ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm) et de culots bactériens de <i>P. fluorescens</i> en phase exponentielle (19 h de croissance, $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm) et en phase de déclin (26 j de croissance, $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 et 514 nm), réseau à 1200 traits .....	105
Figure III.10 : Spectres Raman polarisés d'un culot semi-hydraté de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 et 488 nm) et de cytochrome <i>c</i> du cœur bovin. Les bandes sur fond gris sont les bandes présentant une polarisation inverse, réseau à 1200 traits, * : bandes du solvant .....	106
Figure III.11 : (A) Courbe de croissance de <i>P. fluorescens</i> , un agrandissement de la cinétique entre 0 et 12 h est présenté en insertion, (B) deux exemples de courbes de croissance d' <i>E. coli</i> dans du LB 25 g/L, (1). phase de latence, (2). phase exponentielle de croissance, (3). Fin de la phase exponentielle, (4). phase stationnaire .....	108
Figure III.12 : Spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de <i>P. fluorescens</i> recueillies à différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 14 (fin de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), 48 h, 62h, 4j et 10j (moitié de la phase stationnaire), 26 et 35 j (phase de déclin), et du cytochrome <i>c</i> . Les spectres des culots bactériens sont normés par rapport à la bande à $1003\text{ cm}^{-1}$ . $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits. ....	110
Figure III.13 : Agrandissement de la région entre $900$ et $600\text{ cm}^{-1}$ des spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de <i>P. fluorescens</i> recueillies à différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 14 (fin de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), 48 h, 62h, 4 j et 10j (moitié de la phase stationnaire), 26 et 35 j (phase de déclin). Les spectres sont normés par rapport à la bande à $1003\text{ cm}^{-1}$ , * : bande du cytochrome <i>c</i> , $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits. ....	111
Figure III.14 : Spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de cultures (A) de <i>P. fluorescens</i> recueillies aux différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), et 26 j (phase de déclin), et (B) d' <i>E. coli</i> recueillies à 1h : phase exponentielle et à 8h : phase stationnaire, $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm, réseau à 1200 traits.....	113
Figure III.15 : Comparaison de la région des vibrations CH dans les spectres de culots bactériens partiellement hydratés de cultures de <i>P. fluorescens</i> recueillies aux différents temps de cultures : 6h (début de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), et 26 j (phase de déclin). Les spectres sont normés par rapport à la bande à $1003\text{ cm}^{-1}$ de la phénylalanine. $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits. ....	114

Figure IV.1 : Spectre IR-ATR typique d'un culot partiellement hydraté de bactéries <i>P. fluorescens</i> planctoniques collectées en fin de phase exponentielle. Cristal ATR en germanium (A.N : acides nucléiques) .....	120
Figure IV.2 : Evolution du profil spectral IR-ATR au cours de la circulation de <i>S<sub>0-Pf</sub></i> . Cristal ATR en germanium. Bornes d'intégration de bandes IR d'intérêt : νOH 3600-3400 cm <sup>-1</sup> (zone bleue claire), AmII (amide II) 1600-1480 cm <sup>-1</sup> (zone bleue foncée), AmIII-AN (amide III et acides nucléiques) 1340-1180 cm <sup>-1</sup> (zone verte), PS (polysaccharides) total 1195-950 cm <sup>-1</sup> (zone rouge).....	122
Figure IV.3 : Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR acquis au cours de la circulation de <i>S<sub>0-Pf</sub></i> . Cristal ATR en germanium. Amide II 1600-1480 cm <sup>-1</sup> , PS (polysaccharides) total 1195-950 cm <sup>-1</sup> , AmIII-AN (Amide III - acides nucléiques) 1340-1180 cm <sup>-1</sup> , total 1800-950 cm <sup>-1</sup> , OH 3600-3400 cm <sup>-1</sup> .....	123
Figure IV.4 : (a) Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR acquis au cours de la circulation du milieu LB/50 (b) Evolution du profil des spectres IR-ATR acquis après 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 et 18h de circulation de LB /50. La référence des spectres est le spectre acquis en début de la circulation de LB/50. Cristal ATR en germanium .....	124
Figure IV.5 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> , suite au test Baclight™. Les deux images correspondent à deux zones différentes du cristal ATR.....	125
Figure IV.6 : Spectres IR-ATR (a) d'un culot partiellement hydraté de bactéries de <i>P. fluorescens</i> planctoniques collectées en fin de phase exponentielle (cristal ATR diamant), et (b) d'un biofilm hydraté de <i>P. fluorescens</i> de 21 h (cristal en germanium), (c) la différence (b-a) multipliée par 3 et décalée pour une meilleure lisibilité, (d) du glycogène (solution de 5g/L, accessoire ATR diamant), * impuretés protéiques dans le glycogène commercial. Les spectres a et b sont normés par rapport à la bande Amide II. ....	127
Figure IV.7 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> , marquage à la ConA-TxR spécifique de résidu de glucose et de mannose .....	128
Figure IV.8 : Spectres Raman des biofilms de <i>P. fluorescens</i> hydratés de 24 h et des culots bactériens de <i>P. fluorescens</i> recueillis en fin de phase exponentielle enregistrés avec différentes longueurs d'onde d'excitation (λ <sub>ex</sub> ). Les spectres sont normés par rapport à la bande à 1003 cm <sup>-1</sup> attribuée à la phénylalanine (* bandes attribuées au moins partiellement au	

cytochrome <i>c</i> , $\Delta$ bande de vibration de l'O <sub>2</sub> ), réseau à 1200 traits (sauf pour les spectres enregistrés avec une $\lambda_{\text{ex}}$ de 530 nm : réseau à 1800 traits). .....	129
Figure IV.9 : Spectres Raman sous différents états d'hydratation d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 21 h : hydraté (vert, en haut), partiellement hydraté (bleu, au milieu) et séché à l'air (rouge, en bas), les spectres sont normés par rapport à la bande de la phénylalanine à 1003 cm <sup>-1</sup> (* : bandes attribuées au cytochrome <i>c</i> , $\Delta$ : vibration de l'O <sub>2</sub> ), réseau à 1200 traits, $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm.....	130
Figure IV.10 : Effet de l'ajout d'un agent réducteur sur la signature Raman d'un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> séché à l'air, $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits .....	131
Figure IV.11 : Spectres Raman enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (a) d'un biofilm hydraté de <i>P. fluorescens</i> , et (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries de <i>P. fluorescens</i> planctoniques collectées en fin de phase exponentielle, les spectres sont normés par rapport à la bande à 1003 cm <sup>-1</sup> de phénylalanine. (c) Spectre de différence résultant de la soustraction a – b, réseau à 1200 traits, * : zone de recollement (C : cytosine, A : adénine, U : uracile, G : guanine, T : thymine, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, AN : acides nucléiques, $\nu$ : vibration d'élongation, $\delta$ : vibration de déformation .....	133
Figure IV.12 : Spectres Raman (a) d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h, $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm (réseau à 1200 traits), (b) différence présenté en Figure IV.11, de glycogène ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm, goutte d'une solution 5mg/mL séchée à l'air), de galactane ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, goutte d'une solution 1mg/mL séchée à l'air), de dextrane ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 530 nm, en poudre), de cellulose ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 530 nm, en poudre) et de laminarine ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 530 nm, en poudre). Réseau à 1800 traits. (* : bandes du support en Ge) .....	134
Figure IV.13 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20 $\mu\text{m}$ de la surface d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h.....	136
Figure IV.14 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) obtenues à différents endroits d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA.....	136
Figure IV.15 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA sur un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h. Les courbes rouges et bleues correspondent à l'ajustement des courbes expérimentales selon les modèles théoriques FJC et WLC respectivement. (a, b, c) Exemples correspondants à différentes régions de la surface analysée. (d, e, f) Agrandissement de zones d'intérêt respectivement des courbes a, b et c. ....	138

Figure IV.16 : (a) Distribution des valeurs $q_{min}$ calculées pour les modèles FJC et WLC, (b) distribution du meilleur ajustement par FJC et WLC. Les deux modèles sont considérés équivalents quand la différence de la qualité d'ajustement est inférieure à 5%.....	139
Figure IV.17 : Propriétés conformationnelles des macromolécules riches en glucose / mannose d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé à pH 7. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA : (a) nombre de ruptures, (b) longueur de la dernière rupture $L_{max}$ , (c) longueur de contour $L_c$ , (d) distance entre deux pics successifs $\delta L$ , (e) forces d'adhésion. * : pourcentage à zéro de 41 %.....	140
Figure IV.18 : Nombre de monomères (a, b) et longueurs de Kuhn, $l_k$ (c) et de persistance $l_p$ (d) des macromolécules riches en glucose d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé dans du LB/50 à pH 7. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, (a, c) modèle FJC, (b, d) modèle WLC.....	142
Figure IV.19 : Spectres IR-ATR enregistrés sur un cristal en diamant de culots bactériens d' <i>E. coli</i> en phase exponentielle (90 min), phase stationnaire (210 min) et phase de déclin (24 h), cultivés dans du milieu LB 25 g/L. Les spectres sont normés par rapport à la bande Amide II. ....	145
Figure IV.20 : (a) Courbe de croissance de la souche <i>E. coli</i> UGB 3152 dans du milieu LB/10, (b) Spectres IR sur un cristal en diamant de culots bactériens d' <i>E. coli</i> en phase exponentielle (105 min), phase stationnaire (210, 300 min) et phase de déclin (24 h), cultivés dans du milieu LB/10, les spectres sont normés par rapport à la bande amide II.....	147
Figure IV.21 : Evolution du profil spectral IR-ATR au cours de l'étape d'adhésion bactérienne : 30 min en mode statique, 2 heures sous un flux de 50 mL/h et (b) Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR. Cristal ATR en germanium. * : bande attribuée au polydiméthylsiloxane (PDMS) provenant des tuyaux en silicone ( <b>cf. chap. II-2.2</b> ).....	148
Figure IV.22 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un jeune biofilm de 2,5h d' <i>E. coli</i> exprimant la GFP (fluorescence verte) à la fin de la circulation de la suspension bactérienne, les images sont prises à deux régions distinctes de la surface du cristal. ....	149
Figure IV.23 : (a) Evolution des aires intégrées des principales bandes IR au cours de la circulation de LB/10. (b) Evolution du profil spectral IR d'un biofilm d' <i>E. coli</i> à la surface	

d'un cristal Ge après 3, 6, 9, 12, 15, 18 et 21 h de circulation du milieu nutritif LB/10. La référence des spectres est le spectre acquis au début de la circulation du milieu LB/10. ....	150
Figure IV.24 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h, exprimant la GFP (fluorescence verte) et marqué à l'iodure de propidium .....	152
Figure IV.25 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d' <i>E. coli</i> marqué par le WGA Alexa Fluor 895 spécifique de PNAG .....	152
Figure IV.26 : Spectres IR-ATR (a) d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h (cristal ATR en germanium), (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries d' <i>E. coli</i> planctoniques collectées en fin de phase exponentielle (accessoire ATR en diamant), (c) la différence (a-b) et (d) du glycogène, solution de 5g/L (accessoire ATR en diamant). (e) Spectre IR (en transmission) de la chitine * impuretés protéiques dans le glycogène commercial. Les spectres a et b sont normés par rapport à la bande Amide II. ....	153
Figure IV.27 : Spectres Raman (a) d'un biofilm hydraté de 24 h d' <i>E. coli</i> ( $\lambda_{ex}$ : 530 nm, réseau à 1800 traits) et (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries d' <i>E. coli</i> planctoniques collectées en fin de phase exponentielle ( $\lambda_{ex}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits). Spectre moyen (c) de spectres du biofilm, (d) de spectre d' <i>E. coli</i> planctoniques, (e) la différence c-d. Les spectres sont normés par rapport à la bande à $1003\text{ cm}^{-1}$ de la phénylalanine.....	155
Figure IV.28 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de $20 \times 20\ \mu\text{m}$ de la surface d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h.....	157
Figure IV.29 : Courbes de force-distance expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la WGA sur un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h, chaque courbe de force-distance correspond à une région distincte d'un même échantillon, (* : transition sous forme d'escalier, $\Delta$ : plateau, les flèches indiquent des événements de rupture) .....	158
Figure IV.30 : Schéma explicatif de l'étirement d'un réseau de polymère (a) la transition sous forme d'un pas d'escalier correspond au déroulement des enchevêtrements de polysaccharides au sein du réseau, (b) les plateaux sont attribués au déroulement d'une structure des chaînes enchevêtrées par rupture successive d'une série de liaisons de même type.....	159
Figure IV.31 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en Poly N-acetyl glucosamine (PNAG) d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h obtenues par SMFS avec des sondes fonctionnalisés avec la WGA. Distributions statistiques des (a) $L_{max}$ et des (b) Forces d'adhésion, * : pourcentage à zéro = 46% .....	160

Figure V.1 : Spectres IR-ATR d'un très jeune biofilm de 3h de <i>P. fluorescens</i> enregistrés à la fin de circulation de la suspension $S_{0-Pf}$ (trait rouge) et au début de circulation de LB/50 (trait bleu) au pH 7 (3h et 42 minutes) et 3 (3h et quelques minutes). Cristal ATR en germanium. Le spectre de référence est le premier spectre enregistré suite à la circulation de la suspension $S_{0-Pf}$ .....	166
Figure V.2 : Spectres IR-ATR après 15, 45 min, 2, 3, 5,5 et 18 h de la circulation de LB/50 à pH 7 et 3. Cristal ATR en germanium. Les spectres ont comme référence le premier spectre enregistré suite à la circulation de LB/50.....	169
Figure V.3 : Comparaison de l'évolution des spectres IR-ATR d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> durant 21 h de circulation de LB/50 à pH 7 et 3. Cristal ATR en germanium.....	170
Figure V.4 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> , formé sous condition de stress acide, suite au test <i>BacLight</i> <sup>TM</sup> , (mélange de Syto 9, fluorochrome vert des cellules intactes, et d'iodure de propidium, fluorochrome rouge des cellules à membranes endommagées), les images présentées sont enregistrées à deux endroits différents du cristal.....	173
Figure V.5 : Spectres Raman d'un biofilm hydraté de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé dans un milieu LB/50 à pH 7 et 3. Longueur d'onde d'excitation : 530 nm. Les spectres correspondent à des régions différentes des biofilm et sont normés par rapport à la bande à 1003 $cm^{-1}$ , réseau à 1800 traits ( $\Delta$ , * bandes attribuées au Ge et à l' $O_2$ respectivement).....	174
Figure V.6 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de <i>P. fluorescens</i> , marquage au ConA-TxR spécifique de résidus de glucose et de mannose, les images correspondent à deux endroits différents du cristal.....	176
Figure V.7 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20 $\mu m$ de la surface d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé à pH 3.....	177
Figure V.8 : (a, c-f) Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA sur un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé à pH 3, (b) agrandissement d'une région d'intérêt. Les courbes de force correspondent aux différentes régions d'un même biofilm. Les courbes rouges et bleues correspondent à l'ajustement de ces courbes respectivement selon les modèles théoriques FJC et WLC.....	178
Figure V.9 : (a) Distribution des $q_{min}$ calculés pour les modèles FJC et WLC, (b) distribution du meilleur ajustement par FJC et WLC. Les deux modèles sont considérés équivalents quand la différence de la qualité d'ajustement est inférieure à 5%. .....	179

Figure V.10 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en glucose d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé en milieu LB/50 à pH 3. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA : (a) nombre de ruptures, (b) $L_{\max}$ , (c) $L_c$ , (d) $\delta L$ , (e) forces d'adhésion, * : pourcentage à zéro = 63 %.....	180
Figure V.11 : Nombre de monomères (a, b) et longueurs de Kuhn, $l_k$ (c) et de persistance $l_p$ (d) des macromolécules riches en glucose/mannose d'un biofilm de <i>P. fluorescens</i> de 24 h formé dans dans du LB/50 à pH 3. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, (a, c) modèle FJC, (b, d) modèle WLC .....	182
Figure V.12 : Spectres IR-ATR d'un très jeune biofilm de 3h d' <i>E. coli</i> enregistrés à la fin de circulation de $S_{0-Ec}$ (trait bleu) et au début de la circulation de LB/10 (trait rouge) au pH 7 et 3. Le spectre de référence est le premier spectre enregistré suite à la circulation de $S_{0-Pf}$ . Cristal ATR en germanium .....	185
Figure V.13 : Spectres IR-ATR après 15 min, 2, 3, 8, 12 et 21,5 h de la circulation de LB/10 à pH 3. Les spectres ont comme référence le premier spectre enregistré au début de la circulation de LB/10. Cristal ATR en germanium .....	187
Figure V.14 : spectres IR-ATR de jeunes biofilms d' <i>E. coli</i> de 24h formés sous circulation du milieu LB/10 à pH 7 et 3 comparés au spectre à la fin des 3h d'inoculation bactérienne. Cristal ATR en germanium. Le spectre pris comme référence pour les deux spectres à la fin de la circulation de LB/10 est celui enregistré au début de cette circulation.....	188
Figure V.15 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d' <i>E. coli</i> exprimant la GFP (fluorescence verte) de 24 h formé à pH 3 suite au test <i>BacLight</i> <sup>TM</sup> , a et b correspondent à deux régions d'un même biofilm .....	190
Figure V.16 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h formé à pH 3, marqué par la WGA Alexa Fluor 895 spécifique de N-acétylglucosamine et de l'acide sialique. Les deux images correspondent à deux endroits du cristal .....	191
Figure V.17 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20 $\mu\text{m}$ de la surface d'un biofilm d' <i>E. coli</i> de 24 h formé à pH 3 .....	192
Figure V.18 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la WGA sur un biofilm d' <i>E. coli</i> K12 (UGB 3152) de 24 h formé à pH 3. Les courbes correspondent à différentes endroits de la région analysée.....	193

Figure V.19 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en N-acétylglucosamine d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h formé à pH 3 obtenues par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la WGA. Distributions statistiques de (a) nombre de ruptures, (b) nombre des monomères, (c) longueur maximale de rupture  $L_{\max}$  (d) longueur de contour  $L_c$ , (e) longueur de kuhn  $l_k$  (e) distance entre deux pics successifs  $\delta L$ . \* : pourcentage à zéro de 73%..... 196

Figure V.20 : Comparaison des propriétés conformationnelles des exopolymères riches en N-acétylglucosamine d'un biofilm d'*E. coli* formé à pH 3 (a, c) et à pH 7 (b, d) ; (a, b) longueur de rupture maximale  $L_{\max}$ , (c, d) force d'adhésion..... 197



## Table des tableaux

Tableau II-1 : Produits utilisés et leurs fournisseurs .....	58
Tableau II-2 : Caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés pour les marquages par épifluorescence ( $\lambda$ :longueur d'onde, ex : excitation, em : émission) .....	61
Tableau II-3 : Modes de vibration d'un groupement $CX_2$ .....	68
Tableau II-4 : Profondeur de pénétration en $\mu\text{m}$ de l'onde évanescente en fonction du nombre d'onde (en $\text{cm}^{-1}$ ) [33] .....	73
Tableau III-1 : tentatives d'attributions des bandes Raman dans les spectres de <i>P. fluorescens</i> et d' <i>E. coli</i> ( $\nu$ : vibration d'élongation, $\delta$ : vibration de déformation, PL phospholipides, A.G. acides gras, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, Trp : tryptophane, A : adénine, C : cytosine, G : guanine, T : thymine, U : uracile, ARN : acide ribonucléique, ADN : acide désoxyribonucléique, ar : aromatique, ép : épaulement, sq : squelettique, conf : conformation) .....	96
Tableau IV-1 : Attributions principales des bandes d'absorption IR-ATR dans un spectre de culot bactérien de <i>P. fluorescens</i> recueillies en phase exponentielle. Cristal ATR en germanium $\nu_s$ : élongation symétrique, $\nu_{as}$ : élongation antisymétrique, $\delta$ : déformation .....	120

## Liste des abréviations

<b>AFM</b>	Atomic force microscopy (microscopie à force atomique)
<b>CLSM</b>	Confocal laser scanning microscopy (microscopie confocale à balayage laser)
<b>ConA</b>	Concanavaline A
<b>ConA-TxR</b>	Concanavaline A Texas Red
<b>Cys</b>	Cystéine
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EPS</b>	Extracellular polymeric substances (substances polymériques extracellulaires)
<b>FTIR-ATR</b>	Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier – réflexion totale atténuée)
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>His</b>	Histidine
<b>MEB</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>MET</b>	Microscopie électronique de transmission
<b>MRC</b>	Microspectroscopie Raman confocale
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (tampon de phosphate salin)
<b>PDMS</b>	polydiméthylsiloxane
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>P. fluorescens</i></b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<b>PNAG</b>	Poly $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine
<b>SMFS</b>	Single molecule force spectroscopy (spectroscopie de force à molécule unique)



## Introduction générale

Il est actuellement admis que la majorité des bactéries vivent sous leur forme sessile, c'est-à-dire au sein de communautés complexes appelées biofilms. Les bactéries sont en général enrobées dans une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires ou EPS constituées de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. Les EPS forment, dans la plupart des cas, plus de 90 % de la masse sèche des biofilms, et jouent un rôle essentiel dans la formation de ces derniers. Ils favorisent notamment l'adhésion des bactéries à un substrat, stabilisent la structure tridimensionnelle et permettent l'établissement de microenvironnements hétérogènes au sein du biofilm. Ces organisations microbiennes se forment à la surface de la plupart des matériaux, de type biologique ou non, dans un environnement aqueux et souvent en présence de nutriments. Leur formation est particulièrement problématique dans les environnements industriels (industrie agroalimentaire par exemple) et médicaux (sur les implants médicaux par exemple), et sont à l'origine de pertes économiques importantes. Les biofilms constituent des systèmes complexes et dynamiques qui confèrent aux bactéries des propriétés phénotypiques qui les distinguent de leurs homologues planctoniques. Elles s'avèrent par exemple beaucoup plus résistantes aux stratégies classiques de désinfection et de traitement antimicrobien. Le contrôle de leur formation (inhiber ou favoriser dans certains cas) est ainsi d'une grande importance. Cette maîtrise passe par une meilleure compréhension des déterminants physico-chimiques gouvernant les interactions de ces microorganismes avec leur environnement proche, sachant qu'une intervention sera d'autant plus efficace qu'elle sera menée durant les premières étapes de la formation des biofilms. Mais cela implique de disposer des outils appropriés pour pouvoir sonder *in situ*, aux échelles cellulaire et moléculaire, les propriétés mécaniques et physico-chimiques aussi bien des cellules bactériennes planctoniques que sessiles ainsi que de l'espace intercellulaire des biofilms et en particulier au tout début de leur formation.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail présenté ci-après dont un des objectifs initiaux était de savoir si les spectroscopies vibrationnelles infrarouge (en mode ATR) et Raman (microspectroscopie Raman confocale) combinées à la spectroscopie de force de l'AFM et à la microscopie par épifluorescence pouvaient constituer ces outils appropriés et si oui à quelles conditions.

Pour cela ces différentes techniques ont été mises en œuvre pour étudier l'influence de stress environnementaux sur les propriétés physico-chimiques de jeunes biofilms modèles âgés de 24h en apportant une attention toute particulière sur les propriétés conformationnelles des substances polymériques extracellulaires (EPS) secrétées par les bactéries. Les deux modèles bactériens choisis pour cette étude ont été une souche naturelle et ubiquitaire de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) et une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Le choix de ces modèles bactériens a principalement été dicté par la grande capacité de ces deux souches à coloniser les surfaces et former rapidement des biofilms au bout de quelques heures.

Ce manuscrit regroupe cinq chapitres. Le premier chapitre est consacré à la revue bibliographique concernant les derniers travaux et résultats relatifs aux biofilms. Dans cette partie, nous avons abordé les principales notions concernant les biofilms, notamment leur structure et leur processus de formation. Nous avons également détaillé certains résultats précédents et mis en lumière les différents outils souvent utilisés pour explorer les biofilms. Le deuxième chapitre passe en revue les éléments essentiels des différentes techniques de caractérisation mises en œuvre dans ce travail de recherche à savoir la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman, la microscopie à force atomique, la spectroscopie de force et la microscopie à épifluorescence. Le troisième chapitre est articulé autour de deux objectifs : interpréter la signature Raman des bactéries planctoniques *P. fluorescens* et *E. coli* et étudier les variations spectrales en fonction de la phase de croissance bactérienne. Dans le quatrième chapitre, nous nous sommes intéressés aux premières étapes du développement des biofilms de *P. fluorescens* et d'*E. coli* dans des conditions de croissance non stressantes. Nous avons ainsi suivi *in situ* l'évolution de la composition chimique de ces biofilms au cours des 24 premières heures de leur formation et caractérisé les propriétés conformationnelles des EPS présentes au sein de ces biofilms à la fin des 24 heures. Enfin, nous avons mené une étude approfondie sur les modifications physico-chimiques et métaboliques entraînées par un stress acide appliqué au cours de la formation de ces jeunes biofilms. Le mémoire s'achève par une conclusion générale et des perspectives aux travaux qui ont été accomplis ces trois dernières années.

# **Chapitre I**

## **Revue bibliographique**



## 1. Les biofilms bactériens

### 1.1. Qu'est-ce qu'un biofilm ?

Les biofilms ont été décrits pour la première fois au cours du dix-septième siècle par Van Leeuwenhoek qui a examiné les « animalcules » de sa plaque dentaire. Ce n'est que dans les années 40 que les travaux de Claude Zobell vont aboutir à l'élaboration du concept de l'adhésion bactérienne. Zobell a remarqué que le développement des colonies de bactéries marines a lieu préférentiellement sur une surface [1]. Cette observation a été ensuite étendue à une variété de systèmes microbiens par le groupe de Costerton, qui démontré que la majorité de bactéries (99,99 %) se trouvent sous forme de biofilms et que ces bactéries dites sessiles diffèrent profondément de leurs équivalentes planctoniques [2]. Une simple recherche de publications avec le mot clé « biofilms » montre que les recherches sur les biofilms ont explosé à partir des années 2000 (Figure I.1), avec la réalisation des premières images CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) de biofilms vivants par Lawrence *et al* [3].

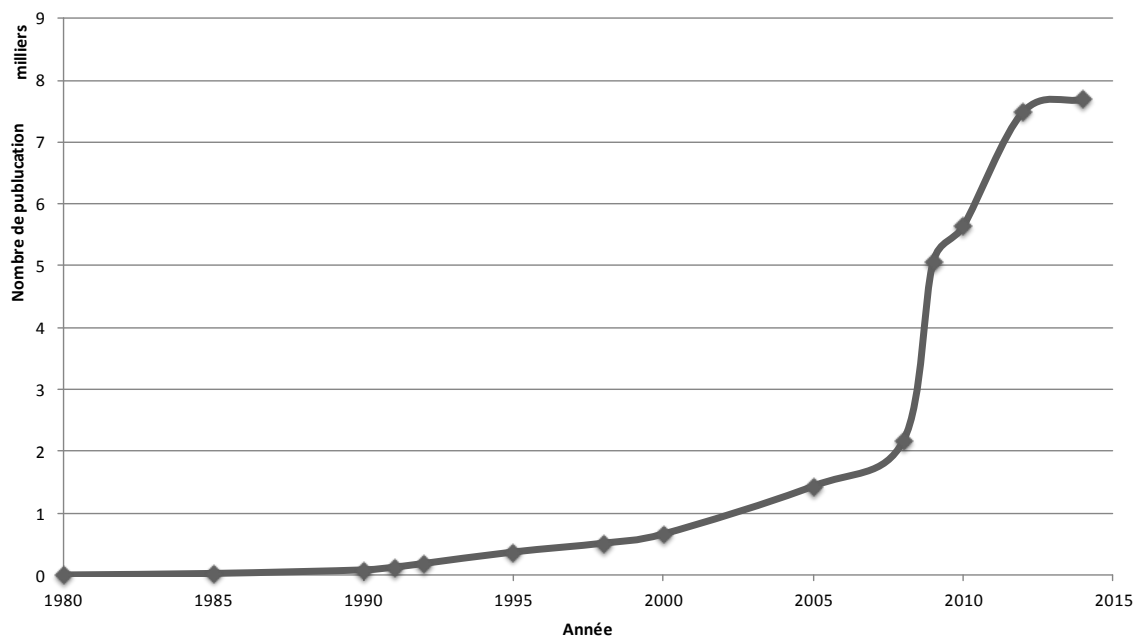


Figure I.1 : Nombre de publications sur les biofilms par année, moteur de recherche : Web of Science, mot clé : biofilms



Actuellement, une définition communément admise pour les biofilms est celle établie en 2002 par Donlan et Costerton : « Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules adhérentes de manière irréversible à un substrat, une interface ou entre elles, enrobées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS pour « extracellular polymeric substances ») auto-sécrétées et qui présentent un phénotype particulier en terme de taux de croissance et de transcription de gènes. » [4]

Les biofilms se développent naturellement sur divers supports dans un milieu aqueux et en présence de nutriments [4]. Le spectre de leurs hôtes s'étend des roches et des canalisations plastiques aux surfaces de tissus eucaryotes [5]. Un aspect souvent négligé des biofilms est leur possible effet bénéfique. En effet, certaines de ces communautés contribuent à l'intégration de nutriments dans les cycles d'énergie et de matière dans divers systèmes aquatiques [6-8]. Les biofilms contenant certaines bactéries ou cyanobactéries jouent également un rôle dans la fixation de l'azote en ammoniac dans divers environnements comme les sols [9, 10] et les océans [11]. Parmi les applications basées sur les biofilms, nous citons à titre d'exemple l'exploitation de leurs propriétés pour le développement des systèmes assurant la biorémediation des eaux usées [12, 13] et la production d'énergie [14-18]. Les biofilms jouent également un rôle de protection naturelle mais aussi imposée [19] de certaines plantes contre les infections fongiques [20], grâce à la production d'antibiotiques et/ou de sidérophores leur conférant ainsi un avantage compétitif suite à la déplétion de fer et d'autres métaux [21]. D'autre part, certains biofilms contribuent à l'équilibre microbien dans le corps humain. Ils s'engagent dans des relations commensales (bénéfice pour un seul sans préjudice pour l'autre) et symbiotique (bénéfice pour les deux) avec l'organisme hôte, c'est-à-dire humain [22, 23].

Cependant, la formation des biofilms est souvent indésirable. Ils se forment d'une manière difficilement contrôlable dans les environnements industriels et hospitaliers mais aussi dans les systèmes de distribution d'eau potable [24, 25]. A l'échelle industrielle, la formation des biofilms sur les condenseurs industriels [26, 27] et les tours de refroidissement de centrales nucléaires [28] par exemple entraînent la diminution de leur efficacité en diminuant les échanges de chaleur, ce qui résulte en des pertes financières importantes. La formation des biofilms est particulièrement problématique dans les industries agro-alimentaires. Ils facilitent la dissémination de microorganismes pathogènes et par conséquent la contamination des produits alimentaires qui sont à l'origine de toxi-infections collectives ou individuelles [29].

Dans les environnements hospitaliers et les systèmes de distribution d'eau potable, les enchaînements possibles sur la santé publique sont évidents. En effet, la formation des biofilms dans les hôpitaux sur les surfaces et les implants médicaux est une source d'infections nosocomiales [30] et chroniques [4, 31]. Nous citons à titre d'exemple la formation des biofilms sur les prothèses valvulaires et sur les cathéters urinaires associée respectivement à l'endocardite infectieuse et aux infections du tractus urinaire. De même, certains biofilms qui colonisent notre organisme constituent souvent un agent de pathogénicité, leur présence serait aussi associée à diverses infections chroniques [4]. On peut citer à titre d'exemple la parodontite associée aux biofilms de la plaque dentaire et la mucoviscidose associée au développement des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) dans les poumons [4, 5]. Concernant les systèmes de distribution d'eau potable, un lien direct entre la qualité microbiologique de l'eau potable et la santé publique a été établi [32], nombreuses crises sanitaires ont été associées à une consommation d'eau potable contaminée [33].

### **1.2. Etapes de formation d'un biofilm bactérien**

Nous précisons que naturellement, les biofilms sont composés de nombreux organismes y compris des bactéries, des algues, des champignons et des protozoaires [34, 35], mais les bactéries sont parmi les colonisateurs initiaux des surfaces. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement aux biofilms bactériens monoespèce, c'est-à-dire composés d'une seule espèce bactérienne. La formation des biofilms se fait en quatre étapes essentielles qui permettent la différenciation d'un groupe de cellules planctoniques en une communauté microbienne sessile. Ces étapes sont résumées dans la Figure I.2. Le cycle de vie d'un biofilm commence avec l'adhésion réversible de bactéries planctoniques sur un support. L'adhésion devient irréversible avec la production des EPS qui se poursuit durant la maturation du biofilm. Le cycle se termine avec le détachement des bactéries sessiles et leur retour au mode de vie planctonique [36].

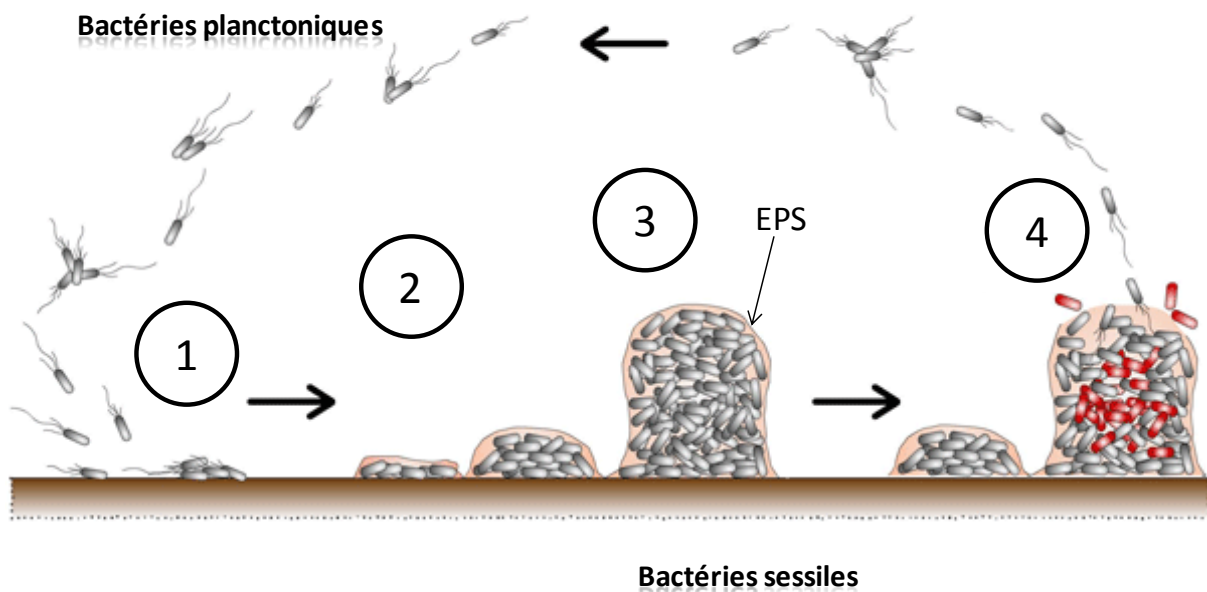


Figure I.2 : Etapes de formation d'un biofilm : (1) adhésion réversible à la surface du substrat, (2) adhésion irréversible accompagnée de la production des EPS et la formation de microcolonies, (3) maturation du biofilm et (4) dispersion. (EPS : substances polymériques extracellulaires), source : Ebcrc.com.au

L'adhésion bactérienne est précédée de la formation d'un film primaire ou d'accroche appelé film conditionnant. D'une manière générale, ce film se forme très rapidement à la surface de matériaux immergés dans un milieu aqueux. Ce film renferme des polymères du milieu et des polymères sécrétés par les bactéries elles-mêmes [37]. Ce film conditionnant modifie certaines propriétés de surface telles que la charge, l'hydrophobie et la toxicité, et peut faciliter l'adhésion ultérieure de bactéries [38].

- L'adhésion bactérienne initiale est une adhésion réversible qui fait intervenir des faibles interactions de type électrostatique et forces de van der Waals entre les bactéries et le support [36, 39]. Elle est influencée par plusieurs facteurs, notamment les forces hydrodynamiques avec une adhésion préférentielle sous conditions de flux élevé, les propriétés physico-chimiques du support, des bactéries [4, 37, 40], et du milieu aqueux (température, pH, force ionique). L'adhésion est également influencée par l'état physiologique de bactéries, celles-ci ont une capacité d'adhésion plus importante durant la phase exponentielle de croissance [1].

- L'adhésion des bactéries au support déclenche des modifications physiologiques qui accompagnent la transition à une adhésion irréversible à la surface [36]. Suite à l'interaction des bactéries avec le support, elles se redistribuent tout au long de la surface et forment des microcolonies, les unités élémentaires d'un biofilm [4]. Ce mécanisme fait intervenir dans certains cas des structures de surface comme les pili de type IV [41, 42]. Les interactions qui s'établissent entre les bactéries au sein d'une microcolonie renforcent les interactions de bactéries avec le support [42]. D'autre part, les bactéries produisent une matrice d'EPS qui les englobe et les protège de stress environnementaux [43]. Cette matrice joue un rôle très important dans la transition à une adhésion irréversible par formation des liaisons entre les bactéries et le support [44].
- La maturation du biofilm se poursuit avec la multiplication bactérienne et la production des EPS. Il en résulte l'élaboration d'une architecture complexe avec l'organisation de microcolonies sous forme de tours ou de structures dites en « champignon ». Ces structures sont séparées par des canaux d'eau [45]. Ces canaux ne contiennent pas une matrice dense d'EPS [46] et permettent la diffusion de l'oxygène et des nutriments, ce qui crée des microenvironnements très hétérogènes au sein du biofilm [37, 45]. Les modifications physiologiques déclenchées suite à l'adhésion bactérienne confèrent aux bactéries sessiles des propriétés qui les distinguent de leurs homologues planctoniques. Ceci correspond à l'expression de gènes spécifiques du mode de vie sessile [4, 45, 47].
- Dans un biofilm mature, un équilibre s'établit entre la croissance bactérienne et le détachement des bactéries ou la dispersion. C'est un phénomène physiologiquement contrôlé, cependant ses bases biologiques sont peu étudiées et/ou mal comprises [48, 49]. La dispersion est divisée en deux processus : l'érosion qui est le détachement continu de bactéries individuelles ou de portions de biofilm, et la desquamation qui est la perte massive de grandes portions du biofilm [50]. Les bactéries détachées ont un profil phénotypique proche de celui de bactéries planctoniques [36]. Ce processus facilite la dissémination des infections [50] et les contaminations dans divers environnements, comme les réseaux de distribution d'eau potable et les environnements cliniques, ce qui pose des problèmes majeurs dans le domaine de la santé publique.

### **1.3. Matrice extracellulaire**

« The EPS matrix that makes biofilms the most successful forms of life on earth », avec ces mots, Flemming et Wingender résument l'importance de la matrice extracellulaire dans la réussite du mode de vie sessile [44]. Cette matrice est fortement hydratée et est formée essentiellement des EPS. Elle constitue l'environnement immédiat de bactéries dans un biofilm et en occupe l'espace intercellulaire. Voyons quels sont les principaux composants de cette matrice et les différentes fonctions qu'elle assure.

#### **1.3.1. Composition de la matrice extracellulaire**

L'expression « substances polymériques extracellulaires » regroupe différentes classes de macromolécules présentes à l'intérieur des biofilms : des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres macromolécules dites substances humiques [43, 44]. Ce sont essentiellement les sécrétions de haut poids moléculaire ainsi que les produits des lyses cellulaires et de l'hydrolyse de macromolécules. Des polymères du milieu environnant peuvent également s'adsorber dans la matrice des EPS [43, 51]. Des composants inorganiques ont été également trouvés dans la matrice extracellulaire [43, 52]. La composition des EPS est très différente d'un biofilm à l'autre. Elle dépend de la nature des microorganismes présents dans le biofilm, de l'âge du biofilm et des différents facteurs environnementaux comme les forces hydrodynamiques, la température et la disponibilité de nutriments et leur nature [34, 43, 44, 53, 54]. D'autre part, la caractérisation des EPS dépend énormément de la méthode d'extraction utilisée, cet aspect sera détaillé dans le paragraphe 3 de ce chapitre. [44, 55]. On distingue en général deux fractions d'EPS selon leur degré de liaison avec les cellules bactériennes : Une de ces fractions, celle des EPS liées est assimilée à un modèle à 2 couches avec une couche interne d'EPS entourant les cellules et y sont fermement liées et une couche externe d'EPS dispersées et faiblement liées aux cellules [43]. L'autre fraction est communément appelée « slime » [56, 57], elle regroupe les EPS faiblement liées aux cellules et celles qui sont libres dans la matrice extracellulaire [43]. Cette fraction présente un effet crucial sur l'activité microbienne et les propriétés de surface des biofilms [43]. Cependant, les études réalisées sur cette fraction sont limitées et la majorité de la littérature sur les EPS concerne les EPS liées [43].

Les polysaccharides sont en général les composants majoritaires des EPS. Ceux de bactéries à Gram négatif sont de nature neutre ou polyanionique, leur caractère anionique est renforcé par la présence de dérivés de l'acide uronique [34, 37, 44], ce qui permet la chélation des cations divalents comme le calcium et le magnésium jouant ainsi un rôle dans la réticulation des polymères et augmentant les forces d'adhésion des biofilms matures [34, 58]. Le poly  $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (PNAG) est un polysaccharide produit entre autres par certaines souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) [59, 60]. C'est un polymère partiellement déacétylé, ce qui lui confère des charges positives et modifie les propriétés électrostatiques des surfaces bactériennes [61]. Ce polysaccharide joue un rôle essentiel dans la stabilisation des biofilms [59]. Autre exemple celui de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), qui produit une variété de polysaccharides dont les résidus de monosaccharides neutres comprennent du rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose et glucose [62, 63], le monosaccharide anionique majoritaire est l'acide uronique [63, 64]. Des productions extracellulaires de glycogène [65] et d'un polymère cellulosique [66-68] ont été aussi rapportées.

### 1.3.2. Fonctions de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire intervient précocement dans le développement des biofilms. Elle joue un rôle dans l'adhésion initiale au support, et forme ultérieurement un réseau tridimensionnel de polymères qui fournit une stabilité mécanique aux biofilms et modèle leur structure [44]. Les EPS forment le squelette de ce réseau. L'architecture d'un biofilm dépend des forces hydrodynamiques auxquelles il est soumis, de la concentration en nutriments, de la mobilité bactérienne, de la communication intercellulaire et de la composition des EPS [44]. Les polysaccharides jouent un rôle essentiel à ce propos, mais également les protéines de la surface bactérienne comme celles qui se lient aux polysaccharides (lectines). Elles constituent le lien entre les cellules bactériennes et les EPS, et participent à la formation et la stabilisation de la matrice [44, 69].

Cette matrice joue également un rôle essentiel dans la protection des bactéries de contraintes externes (stress environnementaux) y compris les agents antibactériens grâce à son effet barrière [34], qui est assuré soit en limitant la diffusion de ces agents à travers le biofilm soit en les piégeant par liaison directe [44, 70]. De plus, la proximité des bactéries à l'intérieur du biofilm permet des communications intercellulaires de type « quorum sensing » qui permettent d'établir un degré de coordination dans les différentes étapes de développement du

biofilm [44]. L'organisation du biofilm se fait de manière à permettre une exploitation optimale de ressources locales [45].

Autre que son rôle structural essentiel, la matrice joue le rôle d'un « système digestif extérieur » grâce aux enzymes extracellulaires libérées par les bactéries [44]. La rétention des débris de cellules lysées en fait également un centre de recyclage. Ceci est particulièrement important dans les biofilms multi-espèces, les différentes espèces ne consommant pas forcément les mêmes nutriments [37]. Les EPS elles mêmes peuvent également servir comme source de nutriments [44]. L'ADN extracellulaire provenant des bactéries lysées joue un rôle dans le transfert horizontal de gènes [44].

### 1.3.3. Paroi bactérienne et structures de surface

La paroi bactérienne est en contact direct avec la matrice extracellulaire et/ou la surface colonisée. Il est donc essentiel de comprendre sa structure pour mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre les bactéries et les EPS de la matrice extracellulaire. La paroi de bactéries à Gram négatif est formée de trois couches (Figure I.3) : la membrane interne ou membrane plasmique, l'espace périplasmique contenant une couche de peptidoglycane et la membrane externe [71].

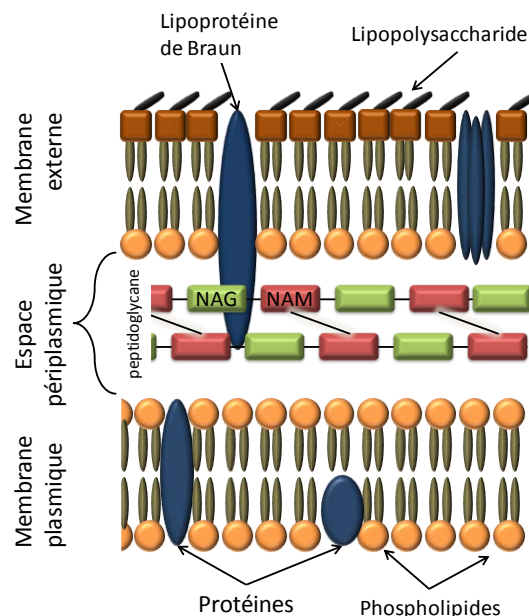


Figure I.3 : Structure de la paroi bactérienne Gram négatif (NAG : N-acétyl glucosamine, NAM : acide N-acétyl muramique)

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche de phospholipides contenant des protéines intégrales et périphériques [71]. La couche de peptidoglycane est elle, constituée d'un réseau de glycanes, formé des résidus alternés de N-acétyl-glucosamine et de l'acide N-acétyl-muramique liées par des liaisons  $\beta$ -1,4. Les chaînes de polysaccharides sont liées par des sous-unités peptidiques attachées à l'acide N-acétyl-muramique [72, 73]. La membrane externe est une bicouche asymétrique formée majoritairement de phospholipides, de lipopolysaccharides et de protéines [71]. Elle est ancrée à la couche de peptidoglycanes grâce aux lipoprotéines de Braun [74].

La membrane externe est, le plus souvent, couverte d'une couche capsulaire amorphe de nature glucidique [71], négativement chargée [72]. Les constituants lipidiques trouvés dans cette couche permettent son ancrage à la membrane externe [72]. La présence de cette structure capsulaire améliore la résistance des bactéries aux réactions immunitaires innées [72]. Un effet d'inhibition de la formation des biofilms par certaines capsules polysaccharidiques a été décrit pour *E. coli* [31].

Différentes structures sont ancrées à la paroi bactérienne et jouent un rôle dans la stabilisation de la matrice extracellulaire : Les flagelles, les fimbriae, et les pili. Ces structures sont formées de sous-unités protéiques. Les flagelles sont ancrés aux trois couches de la paroi bactérienne [72], ils jouent un rôle essentiel dans la mobilité bactérienne et favorisent l'adhésion aux supports en opposant aux forces répulsives à la proximité des surfaces [37]. Les fimbriae sont plus petits et plus rigides que les flagelles [72], ils ont une forme filamenteuse et hélicoïdale régulière [75]. Les pili sont un type de fimbriae. Ils permettent le transfert horizontal du matériel génétique par conjugaison [72]. Les gènes transférés codent généralement pour la production des toxines ou la résistance contre des agents antimicrobiens [72]. La plupart des fimbriae présentent à leur extrémité des adhésines, contenant un domaine lectine qui leur permet d'adhérer spécifiquement à leurs cellules cibles [72, 76]. L'adhésine Fim H associée au pili de type I par exemple, est responsable de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales du tractus urinaire ainsi que de leur internalisation à l'intérieur de ces cellules [77], où elles seront protégées du système immunitaire de leur hôte [77]. En l'absence de sites d'interaction spécifique avec les surfaces à coloniser, ces structures contribuent à l'adhésion bactérienne en altérant l'hydrophobie de la surface bactérienne.



#### 1.4. Réponse des biofilms aux stress environnementaux

Nous avons vu que la formation et le développement des biofilms dépendent fortement des conditions environnementales dans lesquelles ils sont formés, c'est-à-dire des différents paramètres auxquels ils sont soumis. Tout changement de l'un de ces paramètres est en général perçu comme un stress et peut déclencher une réponse particulière au sein d'un biofilm. Il est par conséquent essentiel d'étudier la réponse des biofilms suite à une contrainte extérieure imposée (stress environnemental par exemple), afin d'orienter le développement de stratégies de lutte contre les biofilms mais aussi la maîtrise de leur formation. Nous allons donner quatre exemples de stress environnementaux dont l'effet sur le développement des biofilms est reporté dans la littérature : les contraintes hydrodynamiques, le stress nutritif, le pH du milieu et les antibiotiques.

- Les forces hydrodynamiques ont un effet majeur sur l'architecture des biofilms. Pereira *et al.* [78] ont étudié l'architecture de biofilms de *P. fluorescens* sous régimes d'écoulement laminaire et turbulent. Ils ont montré que les biofilms formés sous des conditions de flux laminaires sont plus épais, moins denses et contiennent une fraction cellulaire plus importante. La densité cellulaire est cependant dans les deux cas, plus importante dans les couches supérieures du biofilm. D'autre part, Stoodley *et al.* [79] ont étudié l'effet de fluctuations à court terme du régime d'écoulement sur l'architecture des biofilms de quatre espèces de bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae* et *Stenotrophomonas maltophilia*). Des biofilms de 23 jours ont présenté une architecture avec des structures filamenteuses. Le changement des conditions hydrodynamiques a provoqué la déformation des biofilms mono et multi-espèces. Ces biofilms présentent en outre, un comportement mécanique de type viscoélastique. Abe *et al.* [80] ont étudié le détachement des biofilms d'eau potable formés sous différentes contraintes hydrodynamiques en appliquant des forces de cisaillement croissantes. Ils ont montré un comportement similaire de type viscoélastique en combinant une approche expérimentale et une théorique. Donc les conditions hydrodynamiques ont un effet sur l'architecture des biofilms non seulement au cours de leur formation, mais ils peuvent également altérer l'architecture des biofilms matures.
- Les environnements naturels des biofilms sont sujets aux variations du taux de nutriments disponibles [81]. Il est donc d'intérêt d'étudier comment les biofilms se développent avec

des ressources limitées en nutriments. Delille *et al.* [82] ont étudié la réponse d'un jeune biofilm de *P. fluorescens* aux variations de concentrations en carbone organique dissous dans l'eau par spectroscopie infrarouge. Ils ont enregistré un détachement partiel du biofilm sous l'action du stress nutritif, celui-ci est associé probablement à la recherche d'un environnement plus favorable en nutriments. De plus, des phases de détachement et de recroissance cellulaire ont été détectées en variant les conditions nutritives. Ils ont pu aussi montrer une augmentation de la tolérance des bactéries soumises à un stress nutritif contre un stress subséquent. D'autre part, Steinberger *et al.* [83] ont étudié la relation entre un apport faible en nutriments et les dimensions de bactéries dans un biofilm de *P. aeruginosa* formé sous atmosphère partiellement humide. Ils ont observé que les bactéries filamentent, c'est-à-dire qu'elles s'allongent en gardant leur diamètre constant, dans le cas d'un apport faible en carbone ou en azote. En revanche, Moryl *et al.* [54] se sont intéressés à la fraction des EPS d'un biofilm de *Proteus mirabilis* et à la quantification de différents composants. Ils ont montré que sous conditions de stress nutritif, les bactéries produisent des quantités plus importantes de polysaccharides. A partir de ces travaux, on peut supposer que les biofilms agissent contre un stress nutritif par un ensemble de mécanismes très différents.

- D'autres facteurs environnementaux comme les conditions acido-basiques du milieu peuvent également affecter la formation et/ ou le développement des biofilms. O'Toole *et al.* [84] ont étudié l'effet de pH (5.0-8.5) sur le développement des biofilms de *P. fluorescens*. Le marquage au cristal violet a montré que l'adhésion initiale de bactéries n'est pas influencée par le pH du milieu dans le domaine considéré. Des gammes plus étendues de conditions acido-basiques ont été testées pour évaluer l'effet du pH sur l'adhésion bactérienne. Mcwhirter *et al.* [85] ont trouvé par spectroscopie infrarouge que l'adhésion bactérienne dans le cas d'un biofilm de *P. aeruginosa* augmente lorsque le pH passe de 4 à 10 pour des forces ioniques faibles ( $0,003 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Par contre, elle est maximale à pH 7 pour une force ionique de  $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$ . Ils ont attribué ces changements aux effets combinés de trois facteurs : la répulsion électrostatique, le degré d'extension de polymères de surface [86] et le métabolisme bactérien. La production des exopolysaccharides peut être également influencée par le pH. Moryl *et al.* [54] ont ainsi rapporté qu'une augmentation de la production de polysaccharides avait lieu dans les biofilms de *Proteus mirabilis* sous conditions acide. Par contre, Jung *et al.* [87] n'ont pas observé de variation dans la production de polysaccharides dans les biofilms de

*Cronobacter sakazaki*. La réponse d'un biofilm à un stress acide dépend fortement de la nature de bactéries qui le composent.

- Un nombre croissant de bactéries développe une résistance aux agents antimicrobiens, leur présence en biofilm favorise ce phénomène [88], donc il est important de comprendre la réponse des biofilms à ces agents. Kumar *et al.* [89] ont étudié l'effet de concentrations infra-inhibitrices des bactéricides sur l'adhésion initiale de bactéries de *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont trouvé que la formation des biofilms est améliorée sous ces conditions. Dynes *et al.* [90] se sont intéressés à l'effet de plusieurs bactéricides en concentrations infra-inhibitrices sur les étapes plus avancées du développement des biofilms de *P. fluorescens*. Ils ont montré la perturbation de l'intégrité membranaire et de la densité cellulaire. Cependant les cellules sont restées métaboliquement actives. D'autre part, Humbert *et al.* [91] ont étudié l'effet d'un peptide antimicrobien sur le développement des biofilms de *P. fluorescens* par spectroscopie infrarouge. L'introduction de peptide antimicrobien entraîne des variations biochimiques et physiologiques importantes dans les biofilms. Le mécanisme inclut l'adsorption de peptide sur la paroi cellulaire et est suivi selon la nature du peptide et sa concentration par l'inhibition de développement du biofilm, le détachement ou la recroissance cellulaire.

### 1.5. Stratégies de régulation des biofilms

Compte tenu de l'importance et de la variabilité des effets indésirables liés à la formation des biofilms, il est d'intérêt majeur de trouver des moyens qui permettent de maîtriser la formation et/ou le développement des biofilms. A l'échelle industrielle, le choix d'une stratégie de lutte dépend de plusieurs facteurs, notamment le coût et le temps nécessaire mais surtout le seuil de développement des biofilms à ne pas franchir [25]. Nous rappelons que les caractéristiques d'un biofilm dépendent fortement des conditions de sa formation, et donc une stratégie efficace dans un cas précis ne le sera pas forcément ailleurs [25, 92]. Le nettoyage mécanique et l'utilisation des systèmes de lavage à haute pression sont parmi les techniques les plus fréquemment utilisées pour l'élimination des biofilms, cependant leur utilisation peut être limitée selon la structure des équipements [27]. Le développement des stratégies anti-biofilm a fait le sujet d'études récentes [93-96]. En revanche, les mécanismes d'action non spécifiques restent privilégiés. Des biocides oxydants comme le dioxyde de chlore et l'ozone

sont souvent utilisés respectivement dans les systèmes de refroidissement et de distribution d'eau potable [25, 92]. Des biocides non oxydants sont également disponibles, mais leurs effets à long terme sur l'environnement sont peu étudiés [25]. Le biocide à utiliser doit être efficace, à utilisation facile et sécurisée, à élimination facile et ne pas engendrer la libération de produits toxiques susceptibles d'interférer avec le processus de production industrielle [97]. Sur le plan clinique, les bactéries sessiles sont plus résistantes aux réponses immunitaires de l'hôte et aux traitements classiques y compris les antibiotiques [93, 98].

En effet, l'efficacité d'une stratégie de lutte est déterminée par sa capacité à éliminer les bactéries mais aussi la matrice extracellulaire, cette dernière protège les bactéries restantes et constitue une source de nutriments [27], mais aussi facilite l'adhésion subséquente des bactéries [92] et donc favorise le rétablissement du biofilm. Certains biocides comme le chlore présentent un effet de dispersion de la matrice extracellulaire [92], d'autres approches consistent à utiliser des enzymes ou des chélateurs d'ions divalents [27]. L'initiation de la formation des biofilms ne nécessite que quelques heures [46], ce qui fait que leur maîtrise demande une intervention régulière [27] à l'origine de pertes financières importantes. Une compréhension plus profonde des aspects moléculaires et physiologiques de la formation des biofilms est essentielle afin de pouvoir développer des nouvelles stratégies mieux orientées pour contrôler (limiter ou accélérer !) leurs formations aussi bien en milieu industriel que médical.

## **2. Les modèles bactériens**

La formation des biofilms dans des systèmes de laboratoire requiert l'utilisation de modèles bactériens permettant d'extraire et de généraliser dans la mesure du possible des informations d'intérêt sur les biofilms. Parmi les modèles bactériens les plus étudiés, on cite à titre d'exemple *E. coli* [99-101] qui est le modèle bactérien le plus étudié génétiquement et *Staphylococcus aureus* [102, 103]. Ces deux bactéries apparaissent au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales [104]. Un autre exemple est *Legionella pneumophila* [28, 105, 106] qui est parmi les pathogènes les plus fréquemment isolés dans les tours de refroidissement. Dans ce travail, nous avons choisi deux modèles bactériens : une bactérie environnementale, *P. fluorescens*, et une bactérie de laboratoire génétiquement modifiée, *E. coli* K12.

## **2.1. *Pseudomonas fluorescens***

*P. fluorescens* appartient au genre *Pseudomonads* de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle est décrite pour la première fois en 1886 par Flügge [107]. C'est un microorganisme unicellulaire, à Gram négatif, en forme de bâtonnet, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Elle est aérobic stricte, oxydase positive avec un métabolisme respiratoire très actif [108]. Ces bactéries produisent un pigment fluorescent jaune-vert soluble dans l'eau, la pyoverdine, dans des conditions carencées en fer [108]. Les souches de *Pseudomonas* peuvent se développer à partir de 4°C [108], elles constituent donc une source de contamination dans les industries alimentaires comme le lait [109] et les poissons [29]. Ce sont aussi parmi les souches aérobies les plus fréquemment isolées dans les emballages des légumes prêt à utiliser [110]. La formation des biofilms de *Pseudomonas* est également problématique dans les environnements médicaux [111]. D'autre part, *P. fluorescens* est utilisée dans le domaine agricole pour la protection des racines de certaines plantes contre les infections fongiques [19].

Nous avons choisi d'utiliser cette bactérie comme modèle bactérien pour l'étude de formation des biofilms pour plusieurs raisons : Notamment, elle a une grande capacité à coloniser les surfaces et à former des biofilms [84, 112], c'est une bactérie ubiquitaire rencontrée dans les sols et les eaux et a des besoins nutritionnels simples [113, 114]. De plus, c'est une bactérie largement utilisée pour l'étude de la colonisation bactérienne des surfaces [84, 112, 115, 116] notamment par le laboratoire LCPME [82, 117, 118].

## **2.2. *Escherichia coli***

*E. coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae* [119], décrite pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich. C'est une bactérie à Gram négatif, en forme de bâtonnet, anaérobie facultative. Certaines souches d'*E. coli* sont des bactéries commensales de l'intestin [120, 121], d'autres sont à l'origine de plusieurs infections humaines [122] et sont à l'origine de plusieurs épidémies dont la cause est la consommation des aliments contaminés par des souches virulentes d'*E. coli* [123, 124]. En France, la plus récente épidémie date de 2005, elle était liée à la consommation des steaks hachés surgelés contaminés [125]. *E. coli* est aussi parmi les bactéries les plus fréquemment isolées dans les biofilms qui se forment sur les implants médicaux. On cite à titre d'exemple les infections associées aux cathéters urinaires [126].

D'autre part, *E. coli* est l'un des modèles bactériens les plus étudiés génétiquement [127], son matériel génétique est facilement manipulable afin d'y introduire des gènes permettant l'expression de phénotypes particuliers. Nous avons utilisé une souche modifiée génétiquement pour produire des quantités importantes de PNAG extracellulaire, un polymère de  $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine. Il est partiellement déacétylé ce qui lui confère des charges positives (Figure I.4). Cette souche présente un taux de formation de biofilms accéléré, mais structurellement typique, par rapport aux autres souches *E. coli* [128].

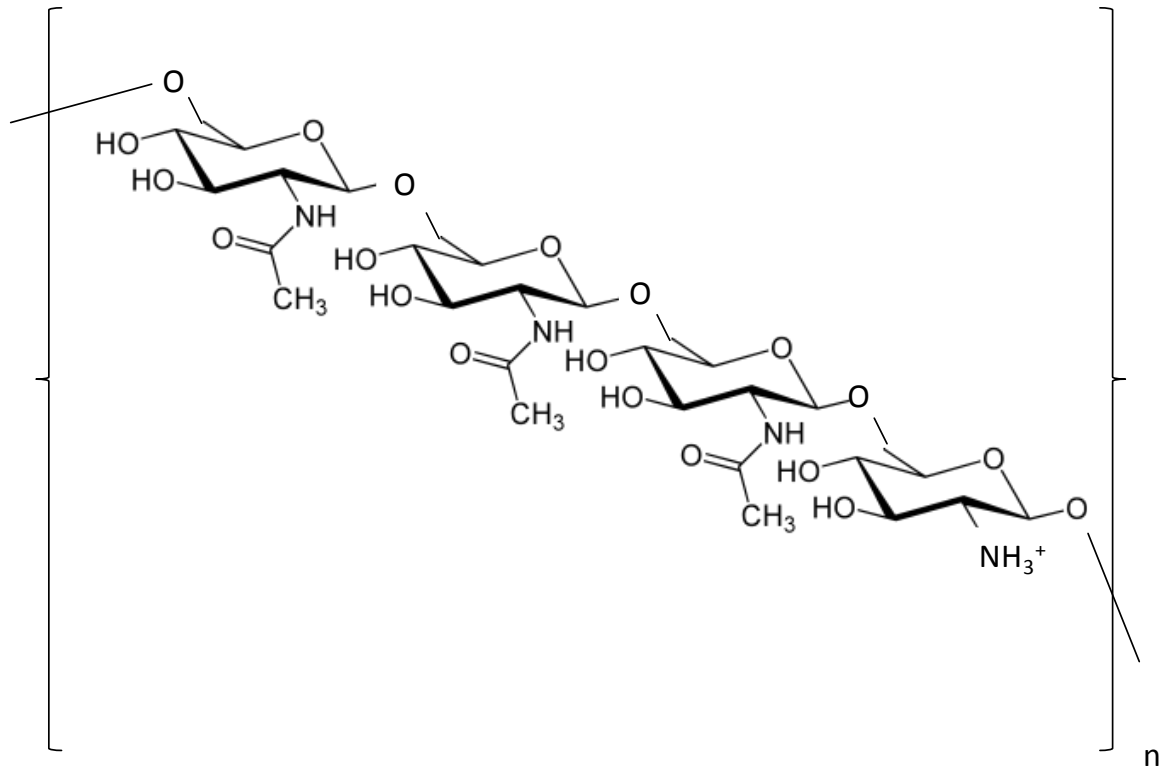


Figure I.4 : structure de la poly  $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine

### 3. Outils d'exploration des biofilms

Il est essentiel de pouvoir étudier l'intégralité des biofilms à différentes échelles : de l'échelle macroscopique jusqu'à microscopique voire nanoscopique. Dans ce but, il est obligatoire de coupler différentes techniques qui permettent notamment de caractériser à la fois la composition chimique et la structure des biofilms à ces différentes échelles et si possible sans les détruire et *in situ*.

### **3.1. Etude de la composition chimique de la matrice extracellulaire**

L'étude de la composition chimique d'un biofilm est généralement précédée par une étape d'extraction, permettant la séparation des fractions cellulaire et extracellulaire ou EPS. La composition chimique globale de la matrice extracellulaire est déterminée essentiellement par les techniques de la biochimie classique comme la méthode de Lowry pour la quantification des protéines [129] et celle au phénol-sulfurique décrite par Dubois *et al.* pour le dosage des polysaccharides [130]. La fraction libre des EPS est toujours extraite par centrifugation. L'extraction de la fraction liée des EPS se fait par des méthodes physiques ou chimiques ou par une combinaison des deux. Les méthodes physiques sont basées sur l'application d'une force externe (créée par centrifugation, sonification ou échauffement) pour favoriser le détachement des EPS et leur solubilisation. Les méthodes chimiques consistent à ajouter un agent chimique comme l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) [131, 132] ou le sulfure [133], pour déstabiliser les interactions entre les EPS et les cellules [43]. Les méthodes d'extraction offrent des rendements différents en fonction des composants de la matrice extracellulaire. En général, l'efficacité d'extraction par les méthodes physiques est inférieure à celle des méthodes chimiques, mais ces dernières posent plus de contraintes liées à la purification et à l'analyse des EPS extraites [43, 131]. Une méthode d'extraction idéale doit conduire à un taux minimal de lyse cellulaire, ne doit pas altérer la structure de polymères et doit libérer et récupérer tous les EPS du biofilm [134]. La lyse cellulaire est généralement évaluée par le taux de composants intracellulaires libérés au cours de l'extraction des EPS, ou par des techniques de marquage qui décrivent l'état de la membrane bactérienne [43]. Généralement, un rapport polysaccharides/protéines faible est indicateur d'une contamination par des cellules lysées. Par contre, un rapport très élevé reflète un rendement faible de la méthode d'extraction [135-137]. En l'absence d'une technique d'extraction standard, fiable et sans biais, le développement des stratégies d'analyse *in situ* des EPS est d'un intérêt majeur.

### **3.2. Exploration de la structure des biofilms**

Plusieurs techniques de microscopie permettent d'explorer la structure des biofilms. Henrici a utilisé la microscopie optique pour observer des biofilms d'eau douce formés sur des lames de verre immergées dans des aquariums et des lacs naturels [138], il a en outre, étudié une grande hétérogénéité au sein de la population bactérienne. Cependant, vu les considérations techniques notamment la profondeur de champ optique, cette méthode est restreinte aux

jeunes biofilms et ne fournit que des informations générales sur la morphologie des biofilms [139]. La séparation des biofilms de leur support est l'une des étapes limitantes lorsque la microscopie optique est envisagée pour l'étude des biofilms matures, comme cela risque d'engendrer une distorsion de leur structure [139]. La combinaison de la microscopie optique aux techniques de marquage fluorescent permet d'acquérir des informations supplémentaires sur la distribution spatiale au sein d'un biofilm [139, 140]. L'utilisation des fluorochromes en combinaison avec la microscopie à épifluorescence permet une meilleure localisation de cellules par l'intermédiaire d'un marqueur des acides nucléiques comme le SYBR Green II<sup>®</sup> [141], et des exopolysaccharides suite à l'utilisation d'un marqueur de sucres comme la Concanavaleine A Texas Red<sup>®</sup> [141]. Cette technique est également limitée aux jeunes biofilms de faible épaisseur [142], l'analyse des biofilms plus épais nécessite des techniques de sectionnement physiques [142] ou optiques. Les microscopies électroniques à balayage (MEB) et de transmission (MET) permettent d'obtenir des images de très haute résolution respectivement de la surface et des sections transversales d'un biofilm [140, 143]. Cependant, ces techniques nécessitent des préparations complexes des échantillons comprenant une étape de déshydratation et d'adjonction de composés chimiques de contraste, susceptibles d'altérer considérablement la structure et la composition de la matrice extracellulaire, celle-ci peut contenir jusqu'à 95% d'eau [4]. La microscopie électronique à balayage environnementale, opérée sous conditions relativement douces, permet de réaliser des études des biofilms faiblement hydratés [144]. L'étude *in situ* des biofilms sans destruction de la matrice extracellulaire a débuté avec l'introduction de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) dans les années 1990. Cette technique est souvent assimilée à la microscopie à épifluorescence avec l'avantage de sectionnement optique, et de fournir donc des images tridimensionnelles des biofilms [145, 146]. Néanmoins, cette technique offre peu d'information sur la composition chimique du biofilm, ainsi que pour l'étude de polysaccharides par exemple, elle nécessite un marquage préalable et donc une connaissance antérieure de la nature de polysaccharides présents. Or, les sucres de la matrice des EPS sont généralement un mélange complexe. Il est de plus en plus utile de combiner différentes techniques permettant de fournir des informations *in situ* à la fois sur la composition chimique et la structure des biofilms.



### **3.3. Application des spectroscopies vibrationnelles à l'étude des biofilms bactériens**

Les spectroscopies vibrationnelles, infrarouge et Raman permettent d'obtenir des informations sur la composition chimique du biofilm. Ces deux techniques appliquées pour l'analyse des systèmes biologiques comme les biofilms, offrent les avantages de la possibilité d'analyses *in situ*, une préparation minimale des échantillons d'où la préservation de leur état d'origine, et ne nécessitent pas une connaissance préalable de la nature des composés présents dans l'échantillon. La spectroscopie infrarouge en mode de réflexion totale atténuée (FTIR-ATR pour Fourier Transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance) permet d'obtenir des informations moyennes sur la composition chimique totale de la couche du biofilm en contact direct avec le substrat (cristal ATR). Ce qui permet d'étudier les variations physiologiques et la composition chimique au cours de premières étapes de formation d'un biofilm. D'autre part, la microspectroscopie Raman confocale (MRC) permet d'obtenir des informations complémentaires de manière localisée pouvant atteindre l'échelle du micromètre et de les associer dans les cas favorables à une information spatiale (structurale) grâce au microscope confocal intégré dans les spectromètres Raman.

#### **3.3.1. La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (FTIR-ATR)**

La spectroscopie FTIR-ATR offre l'avantage d'étudier *in situ* les biofilms sans les perturber ou les dénaturer [147]. Elle permet de sonder les variations chimiques à l'interface cristal-échantillon. Ceci est particulièrement avantageux pour l'étude des premières étapes de formation des biofilms. Cette approche permet l'analyse en milieu aqueux et le suivi de la dynamique de formation des biofilms en temps réel. Ceci est possible par l'utilisation d'une cellule de circulation [118, 148-150], intégrant le cristal (support) à haut indice de réfraction. Des montages permettant le suivi simultané de la dynamique de formation de trois biofilms ont été réalisés par Nivens *et al.* [151]. Schmitt *et al.* ont suivi la formation des biofilms et l'accumulation de biomasse à la surface d'un cristal de Ge pendant trois semaines [147]. Ils ont enregistré dans certains cas une diminution de la biomasse indiquant le détachement de bactéries adhérentes (dispersion). Quilès *et al.* [117] ont étudié les premières étapes de formation d'un biofilm de *P. fluorescens*, ils ont relevé un changement drastique du

métabolisme bactérien au cours de sa formation. Ce changement est associé à la transition des bactéries d'un état planctonique à un état sessile.

L'effet d'un stress environnemental sur la formation et/ou le développement du biofilm peut aussi être évalué par FTIR-ATR. Elzinga *et al.* ont étudié l'effet du pH et du temps de contact sur l'adhésion des cellules de *Shewanella putrefaciens* sur un film d'hématite déposé sur un cristal de ZnSe [152]. Ils ont montré que l'adhésion à ce substrat fait intervenir des groupes fonctionnels à base de phosphate et est fortement influencée par le pH [152]. Suci *et al.* ont étudié la diffusion des agents antimicrobiens à travers un biofilm de *P. aeruginosa* [153]. Ils ont pu détecter des variations dans les profils spectraux suite à l'exposition à la ciprofloxacine, qu'ils ont attribué à un effet indirect de l'antibiotique sur l'ADN bactérien ou à un changement possible du métabolisme bactérien, notamment, la production d'un nouvel exopolymère [153, 154]. Kang *et al.* ont étudié l'effet des ions métalliques sur les biofilms de *P. aeruginosa* [155]. L'intensité globale du spectre IR a augmenté suite à l'exposition à différents solutions de sels métalliques (Cr(III), Ni(II) et Co(II)). Les ions métalliques remplacent l'ion sodium ( $\text{Na}^+$ ) de la matrice et écrantent les forces répulsives entre les exopolymères anioniques. La conséquence directe est leur contraction et le mouvement de bactéries vers la surface du cristal [155]. Parikh *et al.* ont étudié l'effet d'un précipité biogénique de surface sur les biofilms de *Pseudomonas putida* matures [156]. Un changement de la composition chimique totale des biofilms a été enregistré. Plus précisément, une production plus importante de protéines extracellulaires et de polysaccharides totaux [156].

La combinaison de la FTIR-ATR avec la microscopie optique permet dans certains cas de relier en temps réel les modifications chimiques observées par IR aux modifications structurales du biofilm à la surface du cristal ATR. Suci *et al.* ont ainsi pu montrer que dans les conditions de leur étude, l'intensité de la bande amide II est corrélée à la densité bactérienne à la surface du cristal [157]. La combinaison de la FTIR-ATR à la microscopie à épifluorescence permet d'extraire des informations supplémentaires sur la composition de la matrice extracellulaire. Quilès *et al.* [141] ont pu ainsi montrer par microscopie à épifluorescence la localisation extracellulaire d'un sucre de glucose suite à la détection de la signature de glycogène par FTIR-ATR dans un biofilm de *P. fluorescens*.

### 3.3.2. La Microspectroscopie Raman Confocale

Durant les années 1950 et début des années 1960, l'utilisation de la MRC dans le domaine de la biologie était limitée à cause de diverses difficultés techniques. Les informations fournies par la MRC étaient comparables à celles obtenues par la spectroscopie IR, mais avec un coût et un temps d'analyse prohibitifs. L'introduction de la MRC dans le domaine de la biologie a suivi le développement des lasers (années 1960 et 1970) et l'apparition de détecteurs multicanaux. Ses applications possibles s'étendent de l'étude des cellules bactériennes isolées aux biofilms matures. La MRC est utilisée pour l'identification de microorganismes et les études de taxonomie [158, 159], soit à partir de l'empreinte chimique totale de microorganismes [160-162], soit à partir de la signature de certains pigments caractéristiques comme le cytochrome *c* [163, 164], ou les caroténoïdes [164]. Meisel *et al.* ont utilisé la MRC pour l'identification de 19 espèces de bactéries fréquemment rencontrées dans l'industrie de la viande [159]. Comparé aux techniques de génomique récemment développées pour l'identification des microorganismes, les spectroscopies vibrationnelles associées aux outils de la chimométrie, permettent une identification plus rapide, moins coûteuse avec une préparation minimale de l'échantillon [165]. Une des applications possibles est donc l'utilisation de la MRC comme technique d'identification de microorganismes dans un but de diagnostic médical [160, 166]. Rusciano *et al.* ont ainsi pu détecter et identifier la présence de *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (coloniseurs primaires de poumons de patients) dans les expectorations des patients atteints de la mucoviscidose [166]. La MRC est également utilisée pour la caractérisation des populations bactériennes [167, 168]. Schuster *et al.* ont ainsi montré l'hétérogénéité cellulaire sur le plan de la composition chimique au sein d'une culture de *Clostridium beijerincki* [167, 169]. Notamment, une variation de l'intensité relative de bandes attribuées aux polysaccharides (le granulose dans ce cas [167]) et aux protéines. De plus, la MRC est sensible à l'histoire métabolique de bactéries d'une même espèce [162, 168]. Huang *et al.* ont montré que les spectres Raman peuvent refléter l'environnement dans lequel les bactéries sont cultivées [168]. Les bactéries ne se comportent pas de la même manière dans des conditions différentes, d'où une différence entre leur composition chimique totale. Toutes ces études confirment que les considérations taxonomiques, l'histoire métabolique et l'effet de l'environnement sont reflétés dans l'empreinte biochimique et *in fine* dans l'empreinte vibrationnelle et donc sont accessibles à partir des spectres Raman.

La MRC est potentiellement intéressante pour l'étude des biofilms car elle fournit des informations chimiques résolues spatialement à l'échelle du micromètre [170], contrairement

à la FTIR-ATR qui fournit des informations chimiques moyennes sur la couche en contact direct avec le cristal ATR. Dans les cas favorables, elle permet ainsi d'analyser la distribution spatiale de la biomasse au sein d'un biofilm à partir des variations des profils spectraux [171-173], ou en repérant des bandes caractéristiques de certains composés [170], d'étudier la distribution des populations bactériennes dans un biofilm multi-espèces [163, 164, 174, 175], ainsi que de suivre la diffusion de macromolécules à travers les biofilms [171]. La MRC est utile dans l'étude de l'activité des biofilms électroactifs en suivant les propriétés vibrationnelles du cytochrome *c* [176-178]. En effet, sa signature spectrale dépend fortement de son état d'oxydation et reflète donc l'activité électrochimique des biofilms.

La combinaison de la MRC aux techniques de microscopie permet d'obtenir des informations supplémentaires sur la composition chimique. Wagnet *et al.* [179] ont utilisé la MRC pour surmonter les limitations de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM), liées notamment à la nécessité d'utiliser des chromophores spécifiques de certaines EPS, les informations extraites ne représentant donc qu'une fraction des EPS. Dans les conditions de leur étude, il était possible de distinguer les cellules des EPS grâce au microscope optique intégré dans le spectromètre Raman, ils ont pu ainsi détecter par MRC, des variations de la composition chimique des EPS des biofilms hétérotrophes, en fonction de leur âge, non discernables par CLSM.

### **3.4. Application de la microscopie à force atomique pour l'étude des biofilms bactériens**

#### **3.4.1. Introduction**

La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) a récemment émergé parmi les techniques d'étude du monde bactérien [180]. Elle permet, par le balayage de la surface par une sonde d'échelle nanométrique, d'obtenir des images topographiques de la surface de cellules bactériennes avec une résolution pouvant aller jusqu'à l'échelle atomique [181-184]. L'AFM est également conçue comme outil d'investigations moléculaires grâce à la spectroscopie de force [185]. Elle permet d'étudier les propriétés mécaniques et conformationnelles des polymères de surface. Ce type d'études permet d'avoir une meilleure vision des interactions, mettant en jeu les structures de surface, entre les cellules bactériennes et leur environnement [180, 184].

L'étude des systèmes microbiologiques doit se faire préférentiellement dans un environnement aqueux pour se rapprocher des conditions physiologiques afin qu'ils soient dans leur état natif. Or, dans ces conditions, le contact entre les bactéries et le substrat est réduit à une faible surface et n'est assuré que par des faibles liaisons facilement perturbées par le balayage de la sonde AFM, ce qui peut entraîner le détachement des bactéries du substrat et la destruction de l'échantillon [186, 187]. Dans le cas de bactéries planctoniques, il existe différentes méthodes d'immobilisation de bactéries. On distingue l'immobilisation électrostatique, chimique et mécanique. En revanche, dans le cas de biofilms bactériens, l'adhésion des bactéries au substrat fait intervenir des forces plus importantes que celles mises en jeu lors de l'adhésion de bactéries planctoniques à un support ainsi que des interactions complexes entre les cellules bactériennes, les EPS et le substrat. Le détachement de cellules est donc moins problématique, et peut être minimisé en ajustant les paramètres expérimentaux d'enregistrement [150].

### **3.4.2. Imagerie des biofilms bactériens**

Les premières études réalisées sur les biofilms étaient essentiellement orientées vers l'extraction des informations topographiques et morphologiques. Par exemple, Bremer *et al.* ont utilisé l'AFM pour imager l'hétérogénéité des biofilms hydratés sur des surfaces en cuivre [188]. Les travaux ultérieurs de Steele *et al.* sur des biofilms formés sur des surfaces en acier ont été réalisés pour étudier la structure des biofilms et la biodétérioration du matériau [189]. Ils ont visualisé les bactéries et la matrice d'EPS mais aussi la formation des régions de corrosion sur le substrat [189]. Des informations utiles sur les dimensions cellulaires et sur la rugosité de la surface sont ainsi accessibles. Cependant, diverses limitations ont conduit les chercheurs à avoir recours à une étape de déshydratation avant de réaliser les mesures AFM [190-192]. La déshydratation a permis d'obtenir des images à haute résolution et de mieux visualiser les structures de surface. Mais, la déshydratation est susceptible de changer considérablement les caractéristiques des biofilms [193] et donc l'interprétation des résultats doit se faire avec précaution. Différentes études ont évalué l'effet de déshydratation sur les biofilms. Auerbach *et al.* ont imagé des biofilms insaturés en eau, c'est-à-dire formés sous atmosphère partiellement humide, et des biofilms hydratés de *Pseudomonas putida* [194]. Ils ont trouvé que, comparé aux biofilms formés en milieu aqueux, la déshydratation des biofilms non saturés en eau modifie peu leur morphologie et leur rugosité. Actuellement, la plupart des études sont réalisées en milieu aqueux pour perturber le moins possible les biofilms et pour

avoir une meilleure compréhension de propriétés des biofilms [195]. Arce *et al.* [196] ont pu ainsi imager et caractériser d'une manière *in situ* des détails structuraux d'un jeune biofilm de *Haemophilus influenzae*. L'arrivée récente sur le marché de l'imagerie AFM à haute vitesse permet désormais d'enregistrer une image de bactéries en dix secondes avec une résolution nanométrique [197-199] et ainsi de suivre des processus dynamiques. Fantner *et al.* ont ainsi suivi l'action d'un peptide antimicrobien sur des cellules bactériennes d'*E. coli* [197]. Ils ont pu montrer une augmentation progressive de la rugosité de la paroi bactérienne.

### 3.4.3. Caractérisation des biofilms par mesures de force AFM

La spectroscopie de force est un mode de fonctionnement d'AFM, qui mesure les différentes forces s'établissant entre l'échantillon et la sonde AFM, et permet donc d'extraire des informations sur les propriétés nanomécaniques et les forces de surfaces, ainsi que de faire des investigations moléculaires.

- L'élasticité de la surface cellulaire est un exemple de propriétés nanomécaniques accessibles par mesures de force, elle est traduite par le module de Young [200]. Des valeurs de modules de Young de l'ordre du mégapascal ont été rapportées dans la littérature pour des bactéries vivantes [201, 202]. Un autre exemple est la constante de raideur de la cellule bactérienne, qui décrit la pression de turgescence cellulaire [200]. Des valeurs de constante de raideur cellulaire variant entre 0,01 et 0,50 N/m ont été rapportées pour des cellules bactériennes [191, 192]. Une différence de propriétés nanomécaniques de surface entre les bactéries planctoniques et sessiles a été également mise en évidence [191, 192], ainsi qu'une altération de ces propriétés sous conditions de stress [203].
- Les mesures de force de surface ont contribué à la validation expérimentale du modèle DLVO (Derjaguin Landau, Verwer, Overbeek) ainsi que ses limitations [184], notamment en détectant la dépendance de ces forces aux variations de pH et de force ionique [204-206]. L'AFM permet également de mesurer des propriétés physico-chimiques locales en relation avec les forces de surface comme la charge de surface et son hydrophobie [184, 207]. Fang *et al.* [208] ont sondé la variation de forces d'adhésion à la surface d'un biofilm de bactéries sulfato-réductrices. Ils ont pu détecter des forces d'adhésion plus importantes entre la sonde AFM et la surface du biofilm aux interfaces cellule-cellule et cellule-substrat qu'ils ont attribué à l'accumulation des EPS à ces niveaux. D'autre part,

une diminution de forces d'adhésion des biofilms sous conditions de stress a été attribuée à la déstabilisation de la matrice extracellulaire [209, 210]. Par exemple, Oh *et al* [209], ont montré la diminution des forces d'adhésion d'un biofilm *P. aeruginosa* suite à un traitement à l'eau chaude.

- Un mode particulier de la spectroscopie de force consiste à fonctionnaliser les sondes AFM avec des molécules particulières afin de détecter spécifiquement des molécules d'intérêt à la surface de l'échantillon, permettant ainsi d'étudier les propriétés conformationnelles de macromolécules. C'est la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique, ou SMFS pour « single molecule force spectroscopy ». Un exemple d'application est la caractérisation des exopolymères bactériens. Les interactions moléculaires entre ces exopolymères et leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules eucaryotes, jouent un rôle essentiel dans les premières étapes d'une infection bactérienne en facilitant l'adhésion de bactéries aux tissus hôtes. Francius *et al.* [211] ont montré la présence de polysaccharides de différentes natures à la surface des bactéries probiotiques *Lactobacillus rhamnosus GG*. Ils ont étudié les différences entre les polysaccharides de bactéries sauvages et mutantes ayant une capacité d'adhésion aux cellules épithéliales réduite. Les bactéries sauvages montrent des surfaces moins rigides avec plus de polysaccharides. Deux types de polysaccharides ont été détectés à la surface de bactéries sauvages : un polysaccharide de longue chaîne riche en mannose et / ou glucose, et un polysaccharide plus court riche en galactose [211]. Des résultats similaires ont été rapportés par Lebeer *et al.* [212] qui ont associé les mesures de force aux études de biologie moléculaire. La fonctionnalisation des sondes AFM avec des anticorps permet d'étudier les propriétés de protéines de surface qui jouent également un rôle dans l'adhésion bactérienne entre elles et au substrat. El-kirat-Chatel *et al.* ont étudié les propriétés biophysiques d'une adhésine : la lapA, qui joue un rôle dans l'adhésion de *P. fluorescens* [213]. Un effet de substrat sur les propriétés mécaniques de la lapA a été décrite, le déroulement des différentes sous unités protéiques est possible uniquement sur des substrats hydrophiles. L'élongation protéique était diminuée dans les conditions favorables à la formation des biofilms, témoignant une rigidification conformationnelle de la protéine. D'autre part, Lower *et al.* [214] ont pu observer l'expression des cytochromes membranaires sur les membranes externes de *Shewanella oneidensis*.

L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les investigations sont réalisées d'une manière non-invasive, sans prétraitement des cellules bactériennes et dans des conditions qui reproduisent l'environnement physiologique [184]. En plus, la sensibilité de l'ordre du picoNewton permet l'analyse des molécules individuelles, ce qui permet de décrypter les événements moléculaires à la base de divers processus physiologiques et pathogéniques [184]. Cependant, l'AFM ne fournit pas directement d'informations sur la composition chimique de l'échantillon. Sa combinaison avec d'autres techniques de caractérisation, comme les spectroscopies vibrationnelles permet de lever ce verrou. Dans une étude récente de notre laboratoire, SMFS et FTIR-ATR ont été combinées afin d'étudier les exopolymères d'un biofilm de *P. fluorescens* [150]. La production de glycogène a pu ainsi être identifiée grâce à la signature vibrationnelle de ce dernier et sa localisation extracellulaire prouvée grâce aux mesures de force réalisées avec des sondes fonctionnalisées avec de la concanavine A (ConA), lectine spécifique des résidus glucose/mannose. Gerald *et al.* [215] ont étudié par MRC et spectroscopie de force les variations associées avec les phases de croissance de *Pseudomonas putida*. La MRC a mis en évidence un changement de la composition chimique au cours du temps, alors que l'AFM a permis de repérer les variations structurales des surfaces bactériennes tout en montrant une rigidification de la surface au cours de la phase exponentielle de croissance. Pradhan *et al* [216] ont adopté la même approche pour étudier des biofilms d'*Acidithiobacillus ferrooxidans*. La MRC a permis la caractérisation chimique des cellules bactériennes et des EPS alors que leur distribution a été visualisée par AFM.





# **Chapitre II**

## **Matériels et Méthodes**



## 1. Matériel

### 1.1. Souches bactériennes

La souche *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13 (*P. fluorescens*) a été achetée à l'Institut Pasteur (Paris). Après reconstitution du stock bactérien, l'identité des bactéries est vérifiée par le test galerie API 20 NE, bioMérieux. Les cellules de *P. fluorescens* ont généralement une longueur de l'ordre de 1,5 à 2  $\mu\text{m}$  et un diamètre d'environ 0,5  $\mu\text{m}$  [217]. Les souches d'*Escherichia coli* ont été fournies gracieusement par l'équipe du Professeur Jean-Marc Ghigo de l'Institut Pasteur de Paris (Unité de Génétique des Biofilms). Nous avons utilisé deux souches génétiquement modifiées construites à partir de la souche *E. coli*-K12 provenant de la collection ATCC MG 1655 (*E. coli* centre de stock génétique #6300) : UGB 3152 et UGB 2152. Elles sont fluorescentes grâce à l'expression du gène *gfpmut3* transfecté dans leur génome et qui leur permet d'exprimer la protéine GFP (Green fluorescent protein). La souche UGB 3152 est caractérisée par une délétion dans le gène *csrA* (carbon storage regulator). Ce gène code pour une protéine de régulation globale, la CsrA, chez *E. coli* et d'autres bactéries [128, 218]. La CsrA joue un rôle essentiel dans la répression de la formation des biofilms mais aussi l'activation de leur dispersion [219] et est donc impliquée dans la transition planctonique/sessile. Elle contrôle, entre autre, la production d'un exopolysaccharide, la poly- $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (PNAG), qui joue un rôle essentiel dans l'adhésion bactérienne et dont l'inhibition peut bloquer dans certains cas les cellules à l'état planctonique [220]. Phénotypiquement, cette mutation engendre une surexpression de cet exopolymère. La souche UGB 2152 ne présente aucune structure externe, suite à une délétion dans les gènes *fli*, *flu* et *fimA-H*. En outre, ces souches sont génétiquement programmées pour exprimer une résistance spécifique à certains antibiotiques : l'ampicilline et la kanamycine pour UGB 2152, l'ampicilline et le chloramphénicol pour UGB 3152.

## 1.2. Milieux

### 1.2. 1. Milieux de conservation

Les souches bactériennes sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . *P. fluorescens* est conservée dans des cryotubes contenant une solution de 50 % d'un tampon ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 22 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 50 mM, NaCl à 68 mM et  $\text{MgSO}_4$  à 0,8 mM) et 50 % de glycérol (V/V). Les souches d'*E. coli* sont conservées dans une solution contenant 70 % de milieu de culture Luria Bertani (Fluka, LB), et 30 % d'une solution aqueuse de glycérol à 50% (V/V).

### 1.2. 2. Milieux de culture

L'ensemble des cultures bactériennes est réalisé dans du milieu LB selon Miller (Fluka). Ce milieu est composé de 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl. Il est habituellement utilisé à une concentration de 25g/L selon les consignes du fournisseur. A part cette concentration, nous l'avons utilisé avec des concentrations de 2,5 g/L et 0,5 g/L. Les bouillons à ces concentrations seront désignés respectivement par LB/10 et LB/50. Les bouillons LB et LB/10 sont préparés avec de l'eau dé-ionisée (Millipore Corp., Milli-Q). Le LB/50 est préparé avec de l'eau apyrogène stérile (Aqua B. Braun) contenant au maximum 0,5 mg/L de carbone organique dissous pour modifier le moins possible la concentration du bouillon en carbone organique dissous.

## 1.3. Produits chimiques

Le Tableau II-1 regroupe les différents produits utilisés, leurs fournisseurs et les références commerciales.

Tableau II-1 : Produits utilisés et leurs fournisseurs

Nom du produit	Pureté	Fournisseur	Référence
Acétate de sodium	anhydre	Sigma-Aldrich, France	S8750
Acide 11-mercaptoundécanoïque	95 %	Sigma-Aldrich, France	450561
Ampicilline	R & D	Sigma-Aldrich, France	A-9518
Cellulose (acétate de cellulose)		Sigma-Aldrich, France	18,095
Chloramphénicol		Sigma-Aldrich, France	R4408
Chloroforme	HPLC	PROLABO	83627.320

Chlorure de sodium	99,5 %	PROLABO	27 810.295
Concanavaleine A		Sigma-Aldrich, France	C2010
Concanavaleine A Texas Red		Molecular probes, USA	C825
Cyanoborohydrure de sodium	95 %	Sigma-Aldrich, France	71435
cytochrome c		Sigma-Aldrich, France	C-2037
Dextrane		Sigma-Aldrich, France	D-4876
Dichlorure de calcium	Gen-apex	PROLABO	33 604.26
Dichlorure de manganèse, tetrahydraté	> 99+ %	ACROS, Geel, Belgique	205891000
Dihydrogénophosphate de potassium	> 99+ % (très hygroscopique)	ACROS, Geel, Belgique	205925000
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	> 99,9 %	Sigma-Aldrich, France	41640
Dithionite de sodium	R & D	Merck, Damstadt, Allemagne	1.06507.05
Ethanol (EtOH)	≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, France	32221
Ethanolamine	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, France	E-6133
Ferricyanure de potassium		Merck, Damstadt, Allemagne	4973
Galactane		Sigma-Aldrich, France	851396
Glycogène	85 %	Sigma-Aldrich, France	G8751
Hydroxyde de sodium	en perles, anhydre, 98%	Sigma-Aldrich, France	S8045
Hydrogénophosphate de sodium, 12H <sub>2</sub> O	98,5 %	ACROS	271060010
Kanamycine	≥ 95 %	Sigma-Aldrich, France	K-4000
Luria Bertani Bouillon	R & D	Fluka, France	L3152
Luria Bertani Agar	R & D	Sigma-Aldrich, France	L2897
Laminarine		Sigma-Aldrich, France	L-9634
LIVE/DEAD BacLight™		Molecular probes, USA	L7012
N-hydroxysuccinimide – polyéthylène glycol - acétal (NHS-PEG-Acétal)		Université Johannes kepler (Linz, Autrich)	
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	98 + %	ACROS	423905000
Tamis moléculaire 4Å	R & D	Sigma-Aldrich, France	69838
Tampon de phosphate salin (PBS : phosphate buffered saline)	R 1 D	Sigma-Aldrich, France	P4417
Triéthylamine	Puriss >98,5 %	Sigma-Aldrich, France	90340
TRIS Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane	99,9%	Sigma-Aldrich, France	T1503
Wheat germ agglutinin		Sigma-Aldrich, France	L9640
Wheat germ agglutinin Alexa Fluor 594		Molecular probes, USA	W11262

### 1.3.1. Antibiotiques

Tous les antibiotiques sont conservés à -20°C. L'ampicilline est conservée dans une solution aqueuse d'éthanol à 50%, à une concentration de 100 mg/mL. La kanamycine est conservée dans une solution aqueuse à 25 mg/mL. Le chloramphénicol est conservé dans l'éthanol à 25 mg/mL.

### 1.3.2. Lectines

Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement à un ose terminal à configuration spécifique [221, 222]. L'interaction est similaire à la liaison spécifique d'un anticorps à son antigène [222]. Nous avons utilisé deux lectines, la concanavaline A et la Wheat Germ Agglutinin (WGA). Les deux sont conservées à -20°C dans une solution de PBS à 0,1 mg/mL. La concanavaline A, notée ConA, est une lectine extraite du pois sabre (légumineuse proche du haricot) [223]. Elle est spécifique du D-glucose et du D-mannose. L'activité de la ConA nécessite un milieu acide (pH ~ 5) et la présence des ions  $Ca^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  [224, 225]. La lectine WGA est une agglutinine provenant des germes de blé. Elle est spécifique du N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) [226].

### 1.3.3. Fluorochromes

Le Bacterial Viability kit ou *BacLight*<sup>TM</sup> est un test d'intégrité membranaire. Il consiste en un mélange de deux chromophores, le SYTO<sup>®</sup> 9 et l'iodure de propidium, qui fluorescent respectivement dans le vert et le rouge (Tableau II-2). Les deux fluorophores sont des agents intercalants des acides nucléiques. Cependant, ils diffèrent par leur capacité à pénétrer les cellules. La membrane bactérienne est perméable au SYTO<sup>®</sup> 9 et non à l'iodure de propidium. Ce dernier est exclu des bactéries possédant une membrane cellulaire intacte, et ne marque que les bactéries avec une membrane cellulaire endommagée. L'iodure de propidium ayant une affinité plus importante aux acides nucléiques que le SYTO<sup>®</sup> 9, lorsque les deux chromophores sont présents dans une cellule, les acides nucléiques sont marqués par l'iodure de propidium et les bactéries fluorescent dans le rouge [227].

Pour l'étude des EPS, nous avons utilisé des lectines fluorescentes, celles-ci sont souvent utilisées dans ce but [228]. Elles sont rendues fluorescentes par couplage chimique à des fluorochromes. L'assemblage lectine-fluorochrome est de poids moléculaire élevé, ce qui l'empêche de pénétrer à l'intérieur des cellules. Nous avons utilisé la WGA couplée à l'Alexa

Fluor<sup>®</sup> 594 et la ConA couplée au Texas Red<sup>®</sup> (ConA-TxR pour Concanavalline A-Texas Red). Elles sont conservées à -20°C dans des solutions aqueuses à 1 mg/mL. Les caractéristiques spectrales des différents fluorochromes utilisés sont indiquées dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés pour les marquages par épifluorescence ( $\lambda$  :longueur d'onde, ex : excitation, em : émission)

Fluorochrome	$\lambda_{\text{ex}}$ maximale (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ maximal (nm)
WGA Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	590	617
ConA-TxR	595	615
SYTO <sup>®</sup> 9	480	500
Iodure de propidium	490	635
Green fluorescent protein	395	509

## 2. Culture des souches bactériennes

### 2.1. Cultures des bactéries sous forme planctonique

#### 2.1.1. Conditions de culture pour *Pseudomonas fluorescens*

*P. fluorescens* est cultivée dans du milieu LB. Les précultures ou cultures de réveil sont réalisées par inoculation des bactéries prélevées d'un cryotube dans 400 mL de milieu de culture. La suspension bactérienne est incubée à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 h sous agitation magnétique (290 tours / min). A la fin de cette période d'incubation, les précultures ont une densité optique à 620 nm ( $\text{DO}_{620}$ ) autour de  $0,45 \pm 0,05$ . Les cultures sont préparées par dilution d'un volume  $v$  de la préculture dans 400 mL de LB. Le volume à transférer est calculé à partir du facteur de dilution qui permet d'obtenir une  $\text{DO}_{620}$  initiale de la culture que nous avons fixé à  $0,030 \pm 0,002$ . Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que les précultures.

#### 2.1.2. Conditions de culture pour *Escherichia coli*

Des bactéries prélevées d'un cryotube sont suspendues dans 100  $\mu\text{L}$  du milieu LB, la suspension ainsi préparée est utilisée pour l'ensemencement de boîtes de gélose contenant les



antibiotiques appropriés pour chaque souche : ampicilline (100 µg/mL) et chloramphénicol (25 µg/mL) pour UGB3152, ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL) pour UGB2152. L'ajout des antibiotiques crée un milieu sélectif qui prévient la contamination des cultures. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37°C, et conservées à température ambiante pendant deux semaines. Les cultures de réveil sont préparées en inoculant une colonie bactérienne prélevée sur la boîte de Pétri dans 20 mL de LB à 25 g/L avec l'ajout des antibiotiques aux concentrations appropriées. Les précultures sont ensuite incubées pendant 16 h à 37°C sous agitation mécanique (160 tours / min) au bain marie. Les cultures sont préparées le lendemain par ajout de 1,5 - 2 mL de culture de réveil ( $DO_{600} \sim 5$ ) dans 200 mL de milieu LB en ajustant la  $DO_{600}$  initiale à  $0,05 \pm 0,01$ .

Pour l'ensemble des cultures, les lectures de la densité optique sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Helios Epsilon (Unicam) ou un Cary 6000i UV-Vis-NIR en microcuvettes jetables avec comme solution de référence le milieu LB.

### **2.1.3. Préparation des échantillons bactériens pour analyse**

Les bactéries sont récoltées après centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est ensuite lavé à l'eau apyrogène stérile. Une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions permet de récolter les culots bactériens. Pour les mesures en spectroscopie Raman, les culots sont étalés sur des pastilles de germanium et séchés à l'air sous température ambiante pendant quelques minutes. Pour les analyses en spectroscopie IR, les culots bactériens sont déposés directement à la surface d'un accessoire ATR diamant à l'aide d'une pipette stérile.

## **2.2. Formation des biofilms**

### **2.2.1. Dispositif expérimental**

Les biofilms sont formés à la surface de supports en germanium placés dans des cellules d'écoulement. Deux types de support ont été utilisés : un cristal ATR en germanium pour le suivi en spectroscopie infrarouge et un disque en germanium pour les analyses en spectroscopie Raman et AFM. Les dimensions de ces supports sont indiquées sur la Figure II.1.

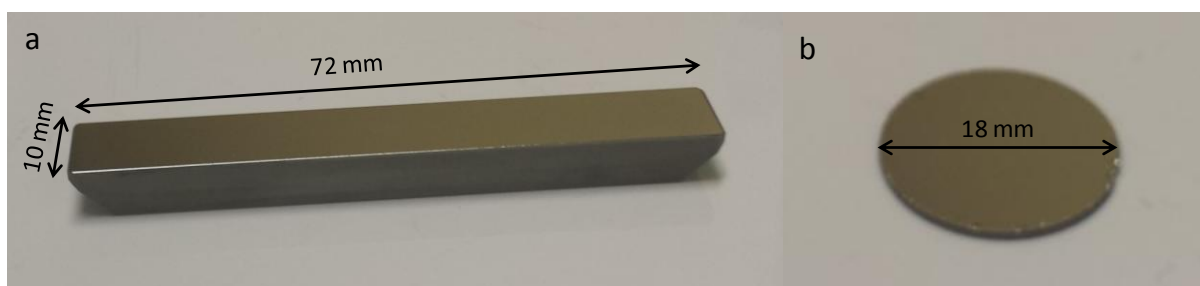


Figure II.1 : Supports utilisés pour la formation des biofilms : (a) cristal ATR en germanium, (b) disque en germanium

Le cristal ATR de germanium est trapézoïdal, avec une surface supérieure de  $7,2 \text{ cm}^2$ . Le disque de germanium est de diamètre égal à 18 mm pour une épaisseur de 2 mm. Le choix du germanium a été dicté par plusieurs raisons. En premier lieu, c'est le matériau de choix pour un suivi en FTIR-ATR des premières étapes de formation d'un biofilm [33]. Il est insoluble dans l'eau, transparent dans l'infrarouge ( $5500\text{-}780 \text{ cm}^{-1}$ ) et présente un haut indice de réfraction, essentiel pour les mesures en ATR (**cf. paragraphe 3.2**). De plus, contrairement par exemple à ZnSe, matériau également utilisé en ATR, il est non cytotoxique, et est stable sur une large gamme de pH de 1 à 14 (données thermo SCIENTIFIC et Pike technologies). Une autre raison importante est l'expertise acquise au cours de ces dernières années par notre équipe dans le suivi par FTIR-ATR sur cristal Ge des étapes initiales de la formation des biofilms [91, 117, 118]. Nous avons donc choisi de réaliser ce travail en utilisant de nouveau ce matériau comme support d'autant que son spectre Raman gêne relativement peu les analyses Raman des échantillons bactériens puisqu'il est susceptible d'interférer avec les spectres bactériens qu'uniquement en dessous de  $600 \text{ cm}^{-1}$  (**cf. chapitre III.1**).

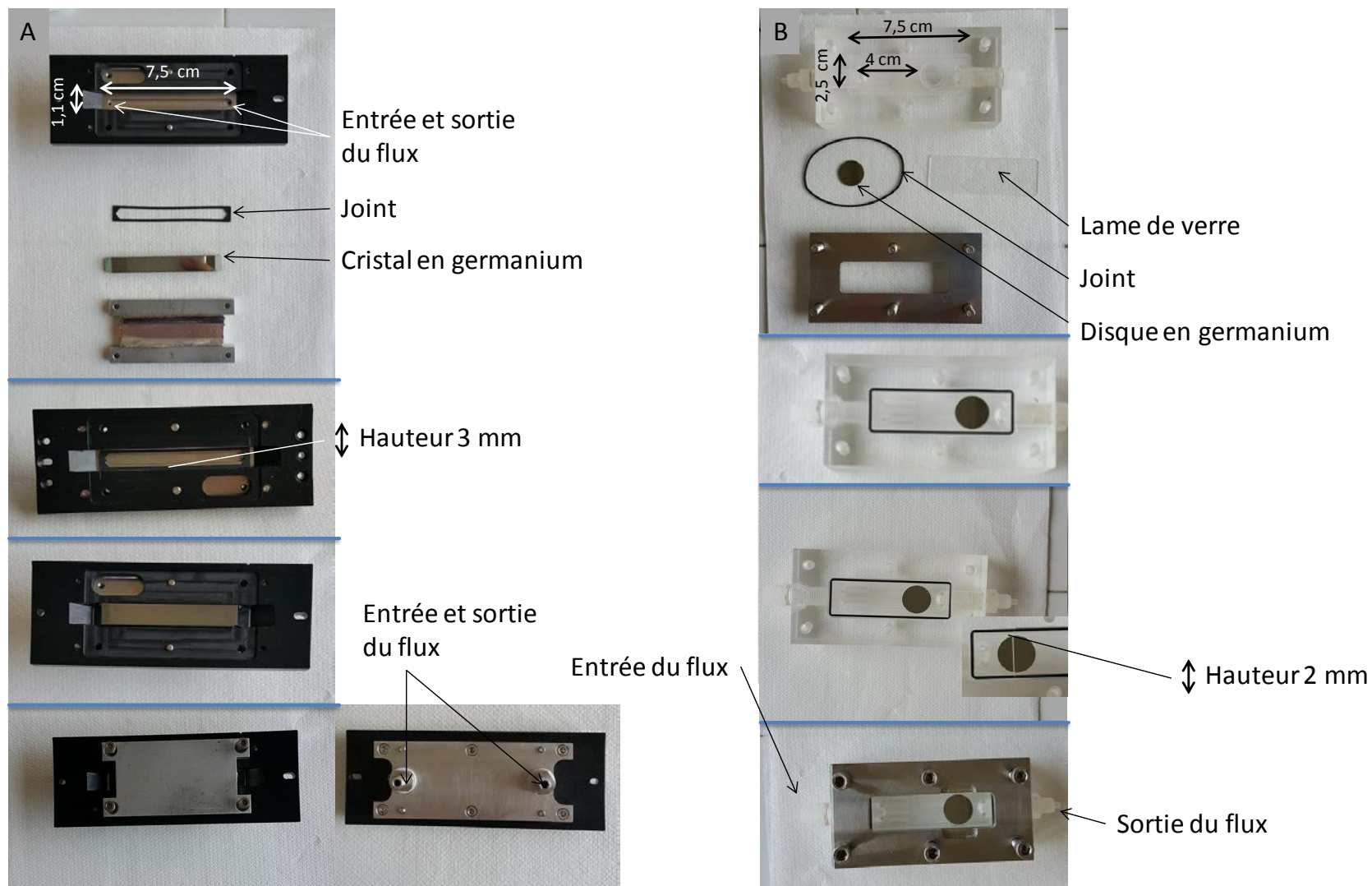


Figure II.2 : photos montrant l'assemblage et les dimensions de cellules d'écoulement utilisées pour la formation des biofilms destinés aux analyses (A) *in situ* et en temps réel en spectroscopie FTIR-ATR et (B) aux analyses par spectroscopie Raman et AFM, la hauteur indiquée correspond à la hauteur de la chambre d'écoulement.

Deux cellules d'écoulement ont été utilisées (Figure II.2) : i) une cellule d'écoulement commerciale adaptée pour le suivi *in situ* et en temps réel par spectroscopie infrarouge des étapes initiales de la formation du biofilm. ii) une cellule d'écoulement fabriquée par nos soins au laboratoire, pour les analyses en spectroscopie Raman (*in situ*) et AFM. Cette dernière cellule a été dimensionnée pour obtenir un flux laminaire, homogène et constant. Concernant la cellule ATR, compte tenu de ses dimensions et du débit utilisé, il est raisonnable de supposer un flux également laminaire. La Figure II.3 présente le montage expérimental utilisé pour la formation des biofilms.

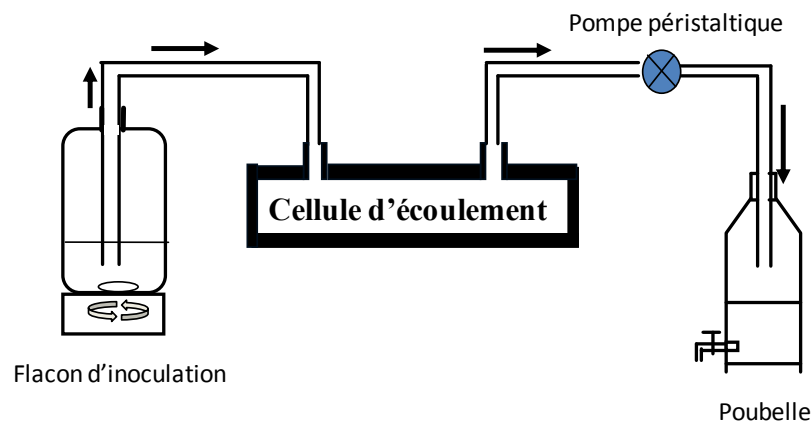


Figure II.3 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la formation des biofilms

La cellule d'écoulement est connectée par des tuyaux en silicone à la bouteille contenant la solution à faire circuler (flacon d'inoculation) dans le système, et à la bouteille « poubelle » de l'autre côté. Le système est en circuit ouvert. Une pompe péristaltique placée en aval de la cellule d'écoulement permet la circulation des différentes solutions à travers le système avec un débit constant. Le système est placé dans une pièce climatisée à 21°C. Les systèmes sont désinfectés avant chaque utilisation par passage d'éthanol à 70 % sous le débit maximal de la pompe pendant cinq minutes, suivi par quatre à cinq heures de circulation avec un débit de 42 ou 50 mL/h pour les biofilms de *P. fluorescens* et *E. coli*, respectivement. Les chambres d'écoulement sont ensuite rincées à l'eau apyrogène stérile pendant la nuit sous le même débit pour éliminer l'éthanol.

### **2.2.2. Biofilms de *Pseudomonas fluorescens***

Des études précédentes de notre équipe ont déterminé les conditions expérimentales optimales pour la formation des biofilms de *P. fluorescens* sur un cristal de germanium [33]. Les biofilms de *P. fluorescens* sont formés en 2 étapes. La première étape consiste à faire circuler une suspension bactérienne dite  $S_{0-Pf}$  avec un débit de 42 mL/h pendant 3h afin de permettre l'adhésion des bactéries à la surface du cristal ATR ou du disque de germanium. La suspension  $S_{0-Pf}$  est préparée à partir d'une culture de 14 h, c'est-à-dire à partir d'une suspension où les bactéries sont en fin de phase exponentielle de croissance (cf. chapitre III.5). Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, et le culot obtenu est resuspendu dans 200 mL de milieu LB/50 en ajustant la densité optique  $DO_{620}$  à  $0,28 \pm 0,01$  ce qui correspond à une concentration bactérienne d'environ  $10^8$  cellules / mL. La deuxième étape consiste à faire circuler sous le même flux, du milieu LB/50 à pH contrôlé, pendant 24h pour permettre la croissance et le développement du biofilm. Le pH du milieu LB est ajusté avec de l'acide chlorhydrique et de la soude. Dans ces conditions, la force ionique du milieu varie peu d'un pH à un autre, elle est égale à  $3,4 \times 10^{-3}$  mol/L. Cette force ionique est calculée en supposant une contribution faible des protéines.

### **2.2.3. Biofilms d'*Escherichia coli***

Les biofilms d'*E. coli* sont formés à partir d'une suspension bactérienne notée  $S_{0-Ec}$  caractérisée par une densité optique  $DO_{600}$  de 0,5. Cette suspension est préparée à partir d'une culture de bactéries en fin de phase exponentielle de croissance (cf. chapitre III.5). Une centrifugation à 3000 g pendant 25 minutes permet de récupérer les bactéries. Le culot bactérien est resuspendu dans une solution de LB/10. La première étape de formation des biofilms est l'adhésion bactérienne au support en germanium. Celle-ci est induite sous condition statique après introduction de la suspension bactérienne pendant une demi-heure. La suspension bactérienne est ensuite mise en circulation avec un débit de 50 mL/h pendant 2h. La deuxième étape est la circulation du milieu nutritif LB/10 à différents pH ajustés avec de l'acide chlorhydrique et de la soude en fonction des expériences. Le temps de circulation en circuit ouvert du milieu LB est de 21,5 h pour assurer le développement des biofilms. La force ionique du milieu d'inoculation est de  $1,71 \times 10^{-2}$  mol/L en négligeant la contribution des protéines.

### 3. Spectroscopies optiques

#### 3.1. Interaction rayonnement-matière

Lorsqu'un rayonnement interagit avec un matériau, un échange d'énergie se fait entre le rayonnement et les molécules du matériau. Cet échange provoque alors la transition d'une molécule d'un niveau d'énergie à un autre, dont la différence d'énergie ( $\Delta E$ ) est égale à l'énergie des photons de l'onde électromagnétique mise en jeu. Les spectroscopies optiques exploitent ce phénomène afin d'obtenir des informations sur la composition chimique d'un échantillon, mais également, sur ses propriétés physiques et chimiques. L'énergie d'un photon est liée à sa longueur d'onde  $\lambda$  par l'équation :

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda \quad \text{II-1}$$

où  $h$  est la constante de Planck ( $6,63 \times 10^{-34}$  J.s),  $\nu$  est la fréquence de l'onde électromagnétique,  $c$  est la vitesse de la lumière dans le vide ( $3 \times 10^8$  m/s).

Le diagramme de Jablonski en Figure II.4 schématise une partie des transitions possibles entre les premiers niveaux d'énergie vibrationnels et électroniques d'une molécule.

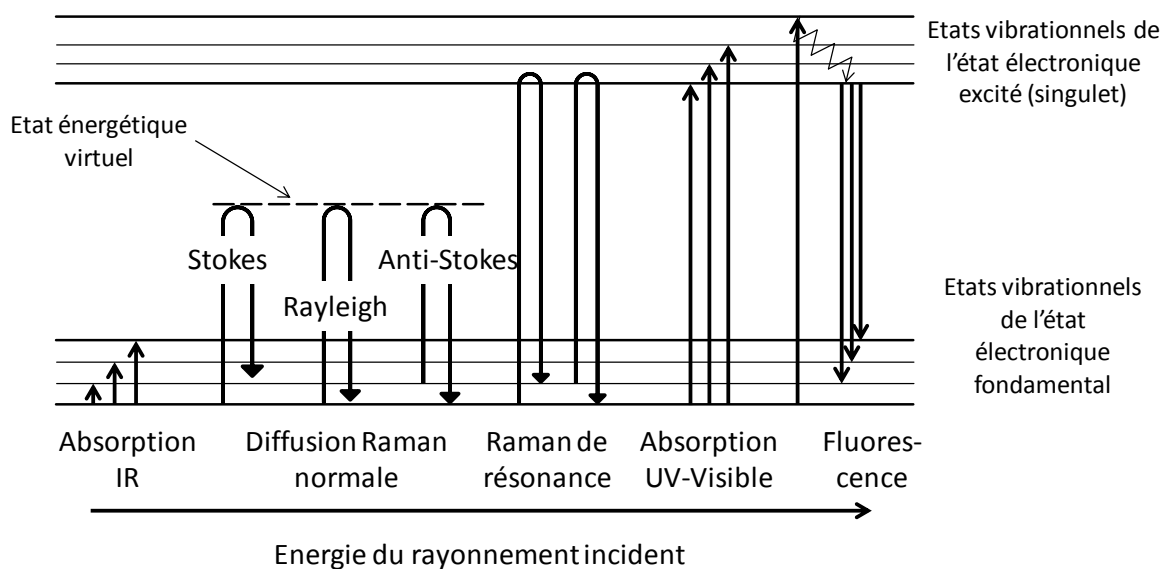


Figure II.4 : Diagramme de Jablonski

En fonction de la nature des niveaux d'énergie impliqués lors des transitions, on distingue deux grandes familles de spectroscopies optiques : les spectroscopies vibrationnelles (absorption IR et diffusion Raman) exploitant les transitions vibrationnelles et les

spectroscopies électroniques (absorption UV-Visible et fluorescence) qui exploitent les transitions électroniques. Notons toutefois qu'il existe d'autres spectroscopies, rotationnelles et électroniques, non mentionnées ici car non utilisées au cours de ce travail.

Avant d'aborder les spectroscopies vibrationnelles, il est utile de donner quelques précisions sur les vibrations moléculaires. Une molécule de N atomes a 3N degrés de liberté, dont trois correspondent à des translations de la molécule entière selon les trois dimensions, et trois à des mouvements de rotation de la molécule autour de son centre de gravité. On peut montrer qu'une molécule peut vibrer selon 3N-6 degrés de liberté correspondant aux vibrations d'atomes selon des modes normaux de vibration. Dans le cas d'une molécule linéaire, deux mouvements de rotation sont possibles, elle a donc 3N-5 degrés de liberté [229]. Les modes de vibration d'un groupement CX<sub>2</sub> sont donnés à titre d'exemple dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 : Modes de vibration d'un groupement CX<sub>2</sub>

Modes d'élongation		Modes de déformation			
		Hors du plan		Dans le plan	
Elongation Symétrique (Symmetric (Stretching)	Asymétrique (Asymmetric)	Torsion (Twisting)	Balancement hors du plan (Wagging)	Cisaillement (Scissoring)	Rotation plane (Rocking)

En spectroscopie IR, un rayonnement IR polychromatique est envoyé sur l'échantillon. On peut montrer que, lorsque l'énergie d'un photon du rayonnement est égale à la différence d'énergie entre deux états vibrationnels, il est absorbé par l'échantillon si, toutefois, la vibration correspondante entraîne un changement du moment dipolaire ( $\vec{\mu}$ ) de la molécule. Les molécules impliquées passent alors dans un état vibrationnel excité [229].

En spectroscopie Raman, on irradie l'échantillon avec un rayonnement monochromatique dans le domaine UV-visible ou encore proche infrarouge. L'énergie des photons du rayonnement incident étant supérieure à celle des transitions vibrationnelles, ce rayonnement

est alors principalement diffusé par l'échantillon. La lumière diffusée peut être : i) de fréquence égale à celle de la lumière incidente ( $\nu_0$ ), c'est la diffusion Rayleigh ou diffusion élastique (la plus probable), ou ii) de fréquence différente de celle de la lumière incidente, écartée de celle-ci d'une valeur égale à la fréquence de vibration correspondante ( $\nu_v$ ), c'est la diffusion Raman ou diffusion inélastique [230, 231]. La diffusion est dite de type Stokes si l'énergie de la lumière diffusée est inférieure à celle de la lumière incidente et de type anti-Stokes si elle est d'énergie supérieure à celle de la lumière incidente. Ce phénomène est lié à la polarisabilité moléculaire  $\alpha$ , qui exprime la faculté du nuage électronique à se déformer sous l'action du champ électrique de la lumière et à acquérir ainsi un moment dipolaire induit  $\vec{P}$ .

$$\vec{P} = \bar{\alpha} \vec{E} \quad \text{II-2}$$

où  $\bar{\alpha}$  est un tenseur de second rang et  $\vec{E}$  est le vecteur du champ électrique de la lumière incidente. On montre que si une vibration moléculaire entraîne une variation d'un élément du tenseur  $\bar{\alpha}$ , traduisant une déformation du nuage électronique, il pourra alors y avoir de la diffusion Raman en plus de la diffusion Rayleigh. L'utilisation d'une lumière incidente polarisée permet d'accéder à des informations sur la symétrie des modes de vibration.

De ce qui précède, il ressort que les spectroscopies IR et Raman exploitent toutes deux les transitions vibrationnelles. Cependant, elles ont des règles de sélection différentes : une vibration n'est active en spectroscopie IR que si elle induit un changement du moment dipolaire des liaisons mises en jeu, alors qu'elle n'est active en spectroscopie Raman que si elle induit un changement de la polarisabilité des liaisons en question, d'où l'intérêt de coupler ces deux techniques pour obtenir un profil vibrationnel complet. Prenons à titre d'exemple le cas d'une molécule qui possède un centre de symétrie. Les vibrations symétriques par rapport à ce centre seront actives en spectroscopie Raman mais non en spectroscopie IR puisque le moment dipolaire reste inchangé. En revanche, les vibrations antisymétriques par rapport à ce centre seront actives en spectroscopie IR mais pas en spectroscopie Raman. C'est la règle de la mutuelle exclusion. Dans ce cas, il n'existe aucune vibration commune aux spectres Raman et IR.

Dans le cas de molécules complexes, elles peuvent être fragmentées en groupements vibrationnels. La présence d'une fréquence dans le spectre vibrationnel est caractéristique de la présence d'un groupement chimique. Ce qui permet de fournir des informations sur la



composition d'un échantillon. Or, une liaison chimique est perturbée par tout ce qui l'entoure, ce qui se traduit sur le spectre vibrationnel par un décalage de fréquences de ses vibrations et permet donc d'extraire des informations sur la structure et l'environnement d'une molécule [229].

Un cas particulier de la diffusion Raman est lorsque l'énergie de la lumière incidente s'approche ou est en résonance avec une transition électronique. Ces deux cas correspondent, respectivement, à un effet Raman de prérésonance et de résonance. Ceci est accompagné par l'amplification de l'intensité des bandes Raman associées avec cette transition [231].

Lorsque l'énergie du rayonnement correspond à celle des transitions électroniques (UV-Visible), les molécules peuvent absorber ce rayonnement et passer à un état électronique excité. L'absorption du rayonnement répond à la loi de Beer-Lambert décrit par l'équation :

$$A_\lambda = \log \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda c l \quad \text{II-3}$$

où  $A_\lambda$  est l'absorbance du milieu à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $I_\lambda$  et  $I_\lambda^0$  sont respectivement l'intensité du rayonnement transmis et l'intensité initiale,  $\varepsilon_\lambda$  est le coefficient d'absorption molaire,  $c$  est la concentration en substance absorbante et  $l$  la longueur du trajet parcouru dans le milieu. Après le passage de la molécule à un état électronique excité, certaines molécules dites chromophores, ont la caractéristique de réémettre de la lumière avec une longueur d'onde différente. En effet, la molécule passe directement à l'état vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité, ce processus correspond à la conversion interne qui est due aux chocs intermoléculaires. La durée de vie de l'état excité s'étend de quelques dizaines de picosecondes jusqu'à quelques nanosecondes. Le retour de cet état à l'état fondamental est accompagné par l'émission d'un photon de fluorescence. Ce photon est d'énergie inférieure à celle du photon absorbé. Le déplacement en longueur d'onde est nommé déplacement de Stokes, il est le résultat de la conversion interne.

### **3.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée**

Pour l'étude de la bioadhésion en solution aqueuse abordée dans ce travail, le mode de la spectroscopie IR le plus approprié est le mode en réflexion totale atténuée. Ce mode repose

sur la « réflexion totale atténuée » d'un rayon IR sur les surfaces internes d'un cristal ayant un indice de réfraction élevé. Selon les dimensions du cristal le rayon subit une ou plusieurs réflexions internes. Le comportement d'un rayon lumineux à l'interface de deux milieux est traduit par la loi de Snell

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad \text{II-4}$$

où  $n_1$  et  $n_2$  sont respectivement l'indice de réfraction du milieu (1) dense d'indice de réfraction élevé, et l'indice de réfraction du milieu (2) de faible indice de réfraction,  $\theta_1$  et  $\theta_2$  sont respectivement l'angle d'incidence et l'angle de réfraction. Dans le cas où  $n_1$  est supérieure à  $n_2$ , et au delà d'un angle critique  $\theta_c$ , la lumière ne pénètre pas dans le deuxième milieu et subit une réflexion totale à la surface du premier milieu. L'angle critique  $\theta_c$  est déterminée d'après la loi de Snell en supposant  $\theta$  égale à  $90^\circ$

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

Dans le cas de la réflexion totale, le rayon IR interagit avec l'échantillon par l'intermédiaire d'une série d'ondes progressives transversales et longitudinales dites ondes évanescentes. Le champ électromagnétique des ondes évanescentes décroît de façon exponentielle à l'intérieur de l'échantillon. La Figure II.5 illustre ce phénomène en prenant l'exemple d'un cristal ATR.

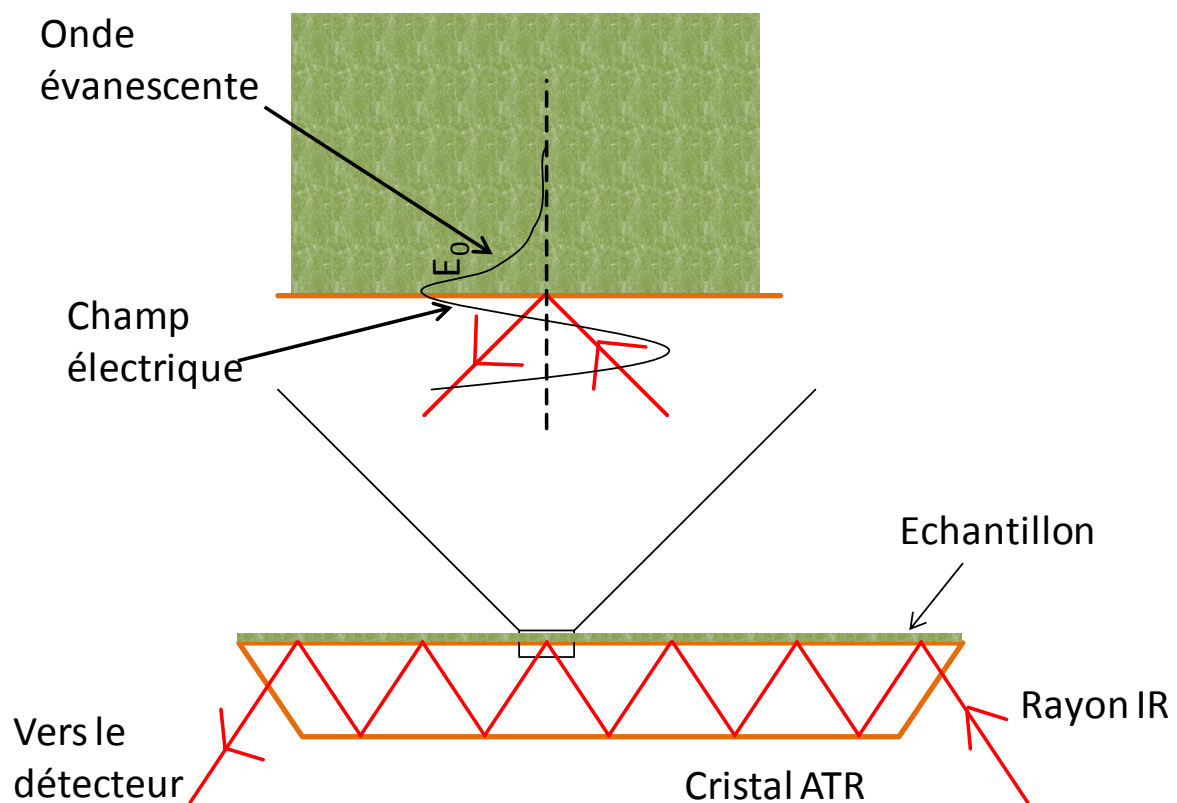


Figure II.5 : Formation d'une onde évanescente à l'interface cristal / échantillon

L'interaction du rayon avec l'échantillon est limitée par la profondeur de pénétration ( $dp$ ), qui est égale à la distance nécessaire pour que l'amplitude du champ électrique décroisse à  $e^{-1}$  de sa valeur initiale. Elle est donnée par l'équation

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}} \quad \text{II-6}$$

D'après l'équation II-6, la profondeur de pénétration est fonction de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence et des indices de réfraction des deux milieux. La profondeur de pénétration est d'autant plus importante que l'indice de réfraction du cristal est plus faible. Vu ces considérations, l'échantillon doit être en contact intime avec le cristal. Dans ce travail, nous avons utilisé un cristal en germanium (Figure II.1) et l'accessoire ATR diamant présenté en Figure II.6. Le rayon IR subit 6 réflexions à l'intérieur de cristal en germanium (Figure II.5).

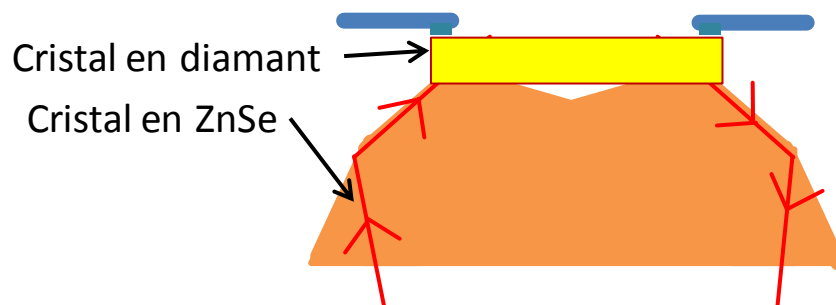


Figure II.6 : Schéma de l'accessoire ATR diamant

L'accessoire ATR diamant est formé de deux cristaux, de même indice de réfraction, l'un en ZnSe et l'autre en diamant. Le rayon IR pénètre dans le cristal ZnSe où il subit une réflexion sur sa surface interne et sera dirigé vers le cristal en diamant. Il le pénètre avec un angle de  $45^\circ$  et subit, neuf réflexions internes. Il retourne dans le cristal ZnSe où il subit une dernière réflexion avant d'être dirigé vers le détecteur.

Le Tableau II-4 résume les valeurs de profondeur de pénétration à certains nombres d'onde d'intérêt, pour des cristaux ATR en Ge d'indice de réfraction 4, et en diamant d'indice de réfraction 2,4. L'indice de réfraction de l'échantillon est fixé à 1,5, qui correspond à l'indice de réfraction moyen d'un biofilm [33, 232, 233]. Cet indice est susceptible de changer au

cours de la formation du biofilm à cause du changement de la composition biochimique au sein du biofilm.

Tableau II-4 : Profondeur de pénétration en  $\mu\text{m}$  de l'onde évanescente en fonction du nombre d'onde (en  $\text{cm}^{-1}$ ) [33]

Nombre d'onde Cristal	2990	1550	1100
Ge	0,22	0,42	0,59
Diamant	0,67	1,29	1,82

Vu l'ordre de grandeur des profondeurs de pénétration, ce mode d'IR permet d'analyser une à deux couches de bactéries, d'où il est adapté pour l'étude de jeunes biofilms.

Dans ce travail, nous avons utilisé un spectromètre BRUKER Vector 22 à Transformée de Fourier piloté par le logiciel OPUS version 5.0 (Bruker), permettant l'acquisition et le traitement des spectres. Le spectromètre est équipé d'une source Globar IR, d'une séparatrice de faisceau en KBr et d'un détecteur thermique en DTGS (Bruker, Germany). Pour chaque spectre, 100 accumulations sont enregistrées avec une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Dans le cas du suivi de la formation des biofilms, l'enregistrement des spectres est automatique, il est programmé pour enregistrer un spectre toutes les 10 minutes durant la phase d'adhésion bactérienne et toutes les 15 minutes durant la circulation du milieu nutritif. Le spectre de référence correspond en général au dernier spectre de l'échantillon précédent. Par exemple, le spectre de l'eau apyrogène stérile correspond au spectre de référence pour les spectres enregistrés durant la phase d'adhésion. Toutefois, dans certains cas, le joint de la cellule de circulation (**cf.** Figure II.2) se déplaçant lors du changement du milieu de circulation, le spectre de référence correspond au spectre acquis juste après le changement du milieu en circulation afin de soustraire la signature IR du joint des spectres acquis. Une autre solution, mais plus délicate, a consisté à soustraire le spectre du joint, enregistré par ailleurs, des spectres acquis. Le traitement des spectres consiste en général en trois étapes : i) le spectre de la vapeur d'eau est soustraite selon la procédure du logiciel OPUS ; ii) la ligne de base est corrigée en se référant à quatre points ( $3750, 2700, 1800$  et  $950 \text{ cm}^{-1}$ ) ; iii) enfin, les bandes d'intérêt sont intégrées : cinq régions correspondant aux différents composants biologiques limitées par :  $3600\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{-}1480\text{cm}^{-1}$ ,  $1340\text{-}1180 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1195\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$  et  $1800\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ . Les spectres ATR présentés dans ce manuscrit n'ont subi aucune correction ATR.

### 3.3. Microspectroscopie Raman Confocale (MRC)

Un spectromètre Raman consiste en : une source d'excitation, une optique de collection de la lumière diffusée par l'échantillon contenant un monochromateur et le système de détection électronique et d'enregistrement. Un schéma descriptif d'un microspectromètre Raman confocal est présenté dans la Figure II.7.

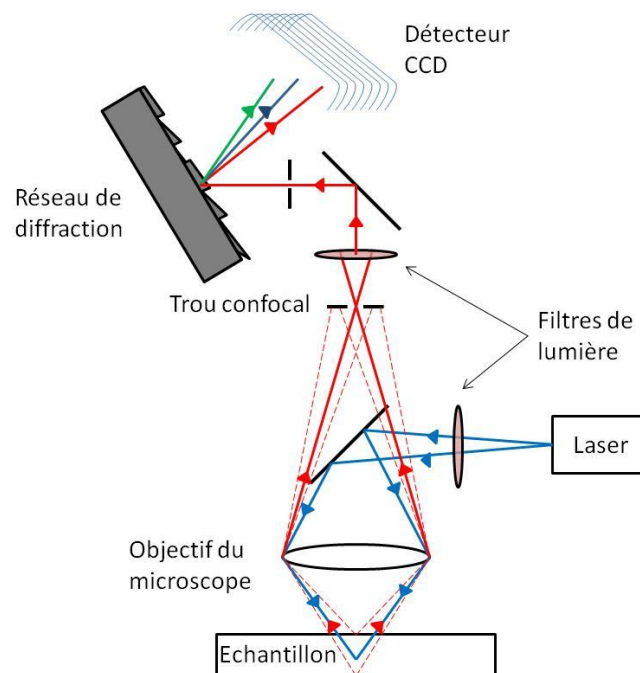


Figure II.7 : Descriptif d'un microspectromètre Raman confocal

Un spectromètre Raman équipé d'un microscope confocal permet de réaliser des études locales avec une échelle du micromètre. La lumière utilisée est une lumière monochromatique. Différentes longueurs d'onde d'excitation peuvent être utilisées selon les objectifs de l'étude. L'intensité de la diffusion Raman est proportionnelle à  $(\nu_0 - \nu_v)^4$ , et à l'intensité de la lumière incidente,  $\nu_0$  et  $\nu_v$  étant respectivement la fréquence de la lumière incidente et de la vibration correspondante à la diffusion Raman considérée. Il est donc d'intérêt d'augmenter l'intensité et la fréquence de la lumière incidente. Cependant, des intensités élevées du laser risquent de provoquer une détérioration thermique de l'échantillon, ceci est particulièrement problématique dans le cas des échantillons biologiques. L'intensité du laser est souvent ajustée par l'intermédiaire de plusieurs filtres atténuateurs placés en

amont du système optique. Dans le cas des échantillons biologiques, le choix de la longueur d'onde d'excitation est également orienté par la possibilité d'émission de fluorescence parasite par certaines molécules biologiques. Ce phénomène peut masquer la diffusion Raman qui est de faible intensité.

Dans le cas de l'étude de l'effet Raman, la lumière en sortie du laser est normalement polarisée grâce à un polariseur placé en aval de la source d'excitation. Selon l'échantillon, la lumière diffusée peut être polarisée soit parallèlement soit perpendiculairement à la lumière incidente. On peut analyser la polarisation de la lumière diffusée en plaçant un polariseur dit analyseur entre l'échantillon et le monochromateur. La polarisation est dite parallèle si les lumières incidente et diffusée sont polarisées dans la même direction. Elle est dite perpendiculaire si elles sont polarisées dans des directions perpendiculaires. L'étude des variations des intensités relatives des bandes Raman en fonction de la polarisation de la lumière incidente et diffusée renseigne sur la symétrie des modes vibrationnels et sur les anisotropies de l'échantillon.

La cellule d'écoulement « Raman » (cf. Figure II.2) a été initialement conçue pour être installée directement sous l'objectif du microscope Raman pour des analyses *in situ* et en temps réel. Cependant, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés techniques. Cette cellule ne nous permet pas d'enregistrer des spectres Raman exploitables sans arrêt de la circulation hydrodynamique dans le système, ce qui empêche le suivi en temps réel mais pas la possibilité d'étudier *in situ* à des instants séparés les biofilms. Cette analyse directe a été possible pour les biofilms *P. fluorescens*. En revanche, en raison de problème de fluorescence, les analyses Raman des biofilms d'*E. coli* ont été effectuées *ex situ*. Dans ce cas, le disque en germanium est enlevé de la cellule d'écoulement, lavé à l'eau apyrogène stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes, et placé dans une boîte de Pétri contenant de l'eau apyrogène sous le microscope Raman pour l'enregistrement des spectres. Ainsi, pour suivre le même protocole, toutes les analyses de l'effet de pH sur la formation des biofilms pour *P. fluorescens* et *E. coli* ont été réalisées *ex situ*.

Dans ce travail, nous avons utilisé un spectromètre Raman T64000 (Jobin-Yvon, France) pour l'enregistrement des spectres. Différentes sources d'excitation sont utilisées : un laser Argon Spectra physics qui émet à 514,5 et à 488 nm, et un laser à double fréquence YAG à 532 (émettant à 530,5 nm). Le choix des longueurs d'onde sera discuté dans le **chapitre III**. La

puissance du laser est réduite par un jeu de filtres atténuateurs pour limiter la détérioration thermique des échantillons, elle est de l'ordre de 7 mW au niveau de l'échantillon. Le spectromètre est équipé d'un microscope confocal Olympus BX41, le laser est focalisé sur l'échantillon à travers un objectif x 80 pour les échantillons partiellement hydratés, un objectif x 60 à immersion dans l'eau pour les échantillons hydratés et un objectif x 50 pour les mesures *in situ*. La focalisation du laser sur l'échantillon a été faite en minimisant la taille du spot laser par observation directe avec la caméra dans le cas des échantillons non hydratés. Dans le cas des échantillons hydratés, la profondeur zéro attribué au support a été déterminée en maximisant son signal Raman. La lumière diffusée est ensuite collectée par le même objectif, le trou confocal du microscope a été fixé à 100 ou 200  $\mu\text{m}$  pour obtenir une résolution axiale de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ . Un filtre Edge permet d'éliminer la diffusion Rayleigh. La lumière est dirigée ensuite dans le spectromètre à travers une fente de 100  $\mu\text{m}$ , un réseau à 1200 ou 1800 traits par millimètre disperse la lumière diffusée, qui sera enfin dirigée vers un détecteur CCD (charge-coupled device) refroidi à l'azote liquide. Les spectres sont enregistrés sur 2 domaines spectraux, de 400 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  et de 2720 à 3450  $\text{cm}^{-1}$ , car la plupart des échantillons biologiques présentent peu de vibrations dans la région de 1800 à 2700  $\text{cm}^{-1}$  [234]. Selon le réseau utilisé, ces domaines sont enregistrés en deux ou trois régions spectrales, dans certains cas, des artefacts apparaissent au niveau des zones de recollement. Les temps d'acquisition étaient de 15 ou 180 secondes avec 48 et trois accumulations respectivement ce qui donne des temps d'acquisition totaux de 15 à 30 minutes. Dans certains cas, un temps supplémentaire de trois à cinq minutes d'exposition au laser a été imposé avant l'enregistrement des spectres pour éliminer l'émission de la fluorescence.

Le logiciel LabSpec 5 pilote le spectromètre et permet l'acquisition et le traitement des spectres. Une correction linéaire de la ligne de base est faite manuellement. Les spectres sont présentés sans lissage des données. La plupart des spectres sont normés par rapport à la bande de la phénylalanine vers 1004  $\text{cm}^{-1}$  attribuée à la vibration du cycle aromatique. Les spectres sont ensuite importés dans Origin 6.1 pour la présentation graphique.

### **3.4. Spectrométrie d'absorption dans l'UV-Visible**

Les spectres d'absorption UV-Visible sont enregistrés avec un spectromètre Cary 6000i UV-Vis-NIR. Les spectres ont été enregistrés dans la région spectrale de 300 à 700 nm. La

référence des spectres était dans chaque cas le solvant de l'échantillon. Nous avons utilisé des cuves en polystyrène à usage unique.

### 3.5. Microscopie à épifluorescence

L'imagerie par épifluorescence exploite le phénomène de la photoluminescence. La lumière excitatrice arrive au niveau de l'échantillon à travers l'objectif du microscope, qui sert également à la collection de la fluorescence émise. Un jeu de filtres permet de séparer les longueurs d'onde de la lumière d'excitation et de la lumière émise.

Pour l'observation en imagerie à épifluorescence, les biofilms sont lavés avec 10 mL d'eau apyrogène stérile afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. La surface du cristal est ensuite divisée en deux parties. Une solution diluée de *BacLight*<sup>TM</sup> est déposée sur la moitié du cristal et une solution diluée de la lectine adéquate est déposée sur l'autre moitié :

- WGA Alexa Fluor 494 (10mg/L) dans le cas des biofilms d'*E. coli*,
- ConA-TxR (0,5g/L) activée dans une solution tamponnée à pH 5 : TRIS (0,06 M), acide maléique (0,04 M), MnCl<sub>2</sub> (0,001 M) et CaCl<sub>2</sub> (0,001 M) dans le cas des biofilms de *P. fluorescens*. La solution est centrifugée avant son utilisation à 12000 g pendant 10 minutes pour éliminer les agrégats.

Le cristal est ensuite placé dans une boîte de Pétri à l'obscurité pendant 20 minutes. L'excès des solutions de marquage est éliminé par lavage avec 10 mL d'eau apyrogène stérile. Le cristal est séché à côté de la flamme d'un bec Bunsen pendant quelques minutes. Le biofilm est réhydraté avec une goutte d'une solution de glycérol sur le côté dédié au marquage par les lectines fluorescentes, et par une goutte de la solution fournie avec le kit *BacLight*<sup>TM</sup> sur le côté dédié à la réalisation de ce test. Une lamelle est enfin placée au dessus du biofilm et une goutte d'huile d'immersion est déposée sur la lamelle avant l'observation au microscope.

Nous avons utilisé un microscope à épifluorescence OLYMPUS BX51, équipé d'une caméra OLYMPUS XC50 pour l'enregistrement des images. La source de lumière est une lampe à mercure et un objectif x100 UPlan FLN à immersion dans l'huile a été utilisé. Les images ont été enregistrées avec le logiciel ANALYSIS<sup>®</sup>. Les taux de recouvrement ont été déterminés sur un nombre n minimal de 20 photos enregistrées de façon aléatoire sur toute la surface du cristal.



## 4. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) a été développée en 1986 [183] à partir des principes de la microscopie à effet tunnel inventée en 1981 par Binnig et Rohrer [235] qui ont reçu le prix Nobel de Physique de 1986 pour cette invention. L'AFM fait partie des microscopies à sonde locale. Ces techniques reposent sur le balayage d'une surface par une sonde de dimensions nanométriques, tout en mesurant les interactions du champ proche entre les deux. Les applications de l'AFM dans les domaines de la biologie et de la santé se sont fortement développées à partir des années 2000. L'AFM offre la possibilité d'étudier les échantillons biologiques dans diverses solutions aqueuses, ce qui permet de se rapprocher de l'environnement physiologique. On distingue deux modes de fonctionnement de l'AFM, l'imagerie et la spectroscopie de force.

### 4.1. Principe.

L'AFM diffère des microscopies conventionnelles par la détection des interactions entre la sonde et la surface, celles-ci permettant la reconstruction d'une image tridimensionnelle. Une sonde AFM repose sur une puce de soutien sur les extrémités de laquelle sont fixés plusieurs microleviers (cantilevers), chaque microlevier porte à son apex une sonde de taille nanométrique (Figure II.8). Les microleviers ont généralement une forme triangulaire ou rectangulaire et sont en silicium ou en nitrure de silicium. Le dos étant couvert d'une couche d'or pour améliorer la réflexion.



Figure II.8 : Schéma d'une puce de soutien de cantilevers à sondes pyramidales (modèle MLCT-AUNM, Bruker AXS Nano)

La **Figure II.9** décrit le principe de fonctionnement de l'AFM. L'échantillon est placé sur une céramique piézoélectrique qui contrôle son déplacement dans les trois directions de l'espace ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ).

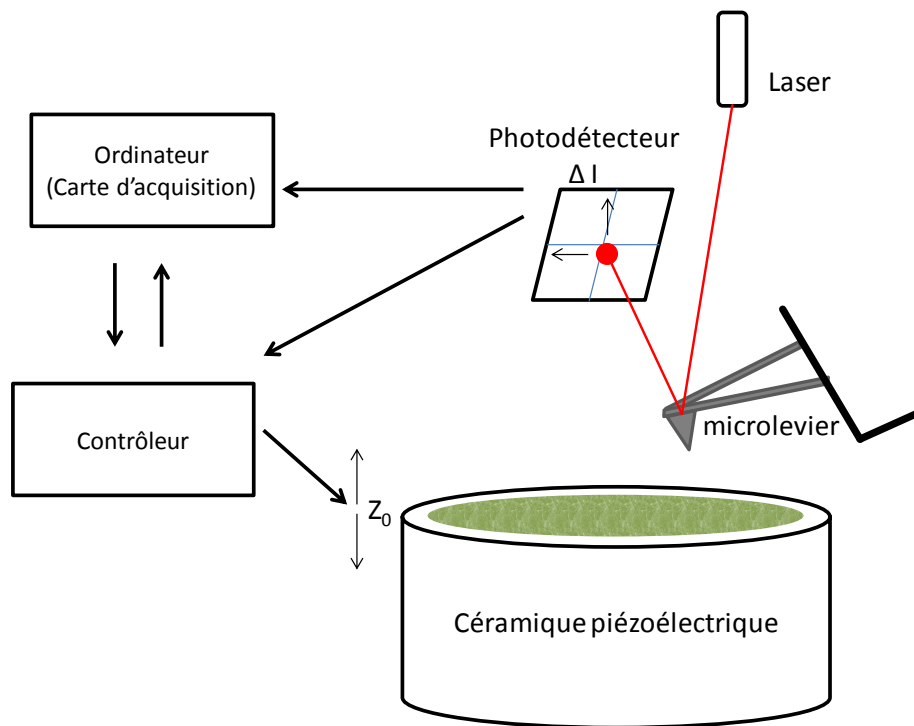


Figure II.9 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique

L'AFM repose sur l'interaction entre une sonde fixée à l'extrémité d'un microlevier réfléchissant et une surface. La position relative entre la sonde et la surface est contrôlée par une céramique piézoélectrique positionnée au niveau du porte-échantillon. En approchant la sonde et l'échantillon jusqu'au contact, on passe d'un régime de forces attractives à un régime de forces répulsives (Figure II.10). Les forces agissantes sur la sonde induisent une déflexion du microlevier. Il sera dévié vers le haut dans le cas des forces de répulsion et vers le bas dans le cas des forces d'attraction. Cette déflexion est suivie par l'intermédiaire d'un spot laser focalisé sur le dos du microlevier et dont la réflexion est collectée sur un photodétecteur à quatre quadrants. La déflexion du microlevier entraîne un changement de la position du laser sur le photodétecteur et change l'intensité reçue par chaque quadrant. Le signal lumineux est converti en signal électrique et est orienté vers le contrôleur du déplacement. Une boucle de rétroaction agit sur la céramique piézoélectrique en appliquant une certaine tension permettant son déplacement vertical pour faire retourner la sonde à sa position d'équilibre, définie par le manipulateur. Il existe trois modes d'opération en AFM. Chacun exploite un type d'interactions entre la sonde et la surface (Figure II.10) : le mode contact, le mode contact intermittent et le mode non contact.

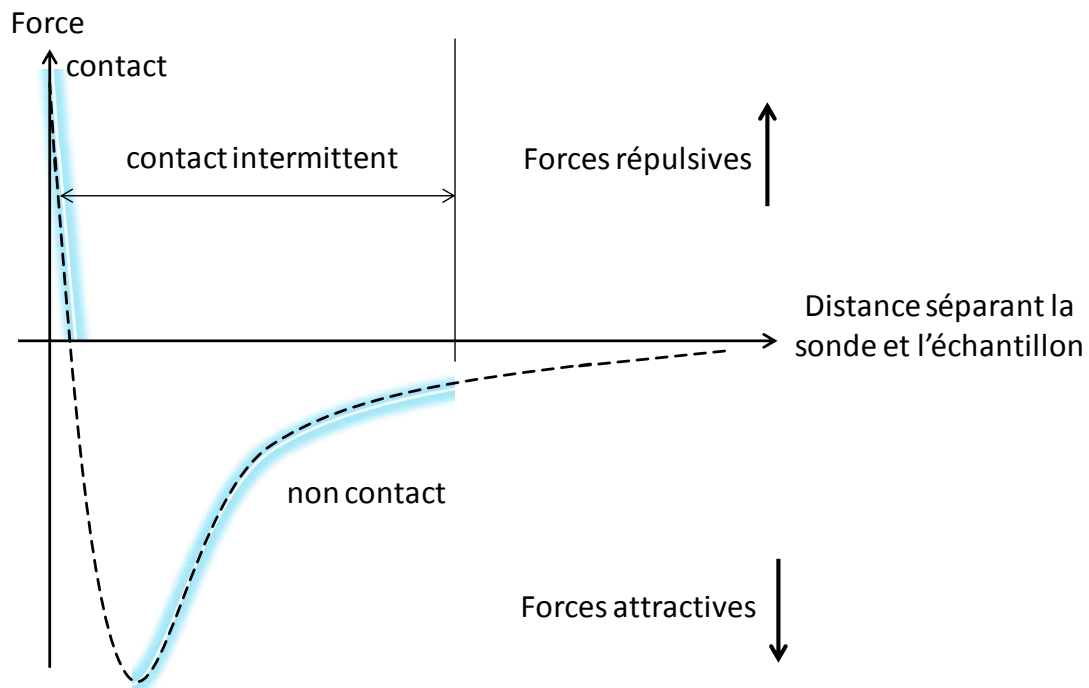


Figure II.10 : Zones d'opération des différents modes d'imagerie en AFM

En mode contact, la sonde et l'échantillon sont maintenus en contact tout au long de l'enregistrement de l'image. La sonde est repoussée par des interactions à courte distance (forces répulsives) et le microlevier est dévié d'une distance ( $d$ ) proportionnelle à la force ( $F$ ) selon la loi de Hooke :

$$F = -k_c d \quad \text{II-7}$$

avec  $k_c$  la constante de raideur du microlevier. La boucle de rétroaction agit de telle sorte à maintenir une force constante [236]. Ce mode fournit des images à une très haute résolution, cependant, la possibilité de déformer la surface de l'échantillon est élevée, ainsi que la contamination de la sonde par les composants de l'échantillon.

En mode contact intermittent (tapping), le microlevier oscille autour de sa propre fréquence de résonance avec une certaine amplitude. Quand la sonde entre en contact avec la surface, l'amplitude de l'oscillation du microlevier sera modifiée. L'amplitude de l'oscillation est directement proportionnelle à la distance moyenne qui les sépare [237]. Une boucle de rétroaction agissant sur la céramique piézoélectrique, permet de maintenir l'amplitude de l'oscillation imposée initialement et de construire une image de hauteur [236]. Dans ce mode, les forces latérales sont réduites, ce qui minimise la possibilité de déformer l'échantillon [236].

En mode non contact, le microlevier oscille autour de sa fréquence de résonance à quelques dizaines voire centaines de  $\mu\text{m}$  de la surface. Ce mode exploite les forces attractives entre l'échantillon et la sonde. Au voisinage de la surface, l'oscillation du microlevier est perturbée par les forces attractives et présente un comportement non linéaire [184]. La boucle de rétroaction s'exerce soit sur la déviation du microlevier, soit sur l'amplitude des oscillations.

## 4.2. Spectroscopie de Force

L'AFM permet en mode spectroscopie de force de détecter et quantifier les forces qui s'établissent entre la sonde et l'échantillon avec une sensibilité de l'ordre de quelques pico Newton (pN) [238]. Ces forces d'interaction sont caractéristiques des propriétés locales de la surface.

### 4.2.1. Mesures de force

En mode spectroscopie de force, la déflexion du microlevier est enregistrée en fonction de la distance de séparation entre la sonde et l'échantillon. La déflexion du microlevier est convertie en force selon la loi de Hooke (équation II-7). Il en résulte une courbe dite de force-distance, qui représente l'intensité des forces entre la sonde et l'échantillon durant une phase d'approche et une phase de retrait. Un exemple de courbe de force est représenté dans la Figure II.11 .

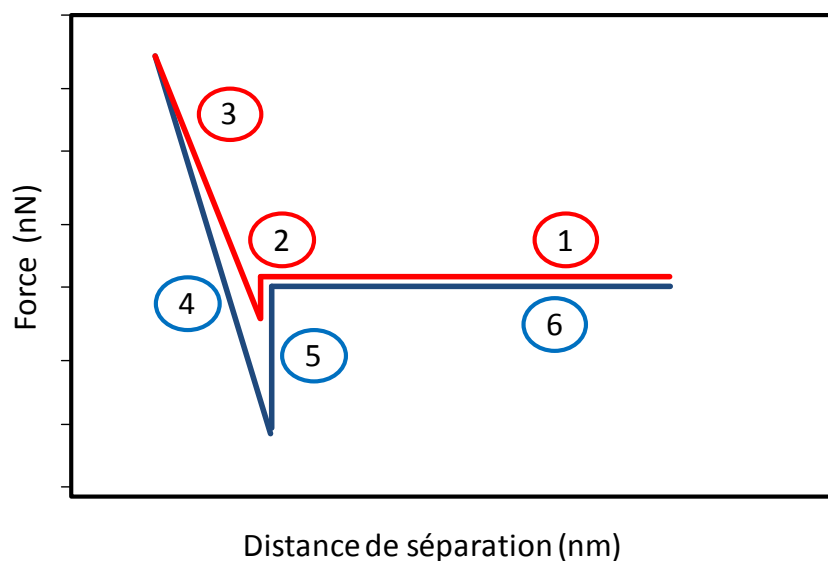


Figure II.11 : Représentation schématique d'une courbe de force, courbe d'approche en rouge, courbe de retrait en bleu

Dans la zone 1 de la courbe d'approche (Figure II.11,1), la sonde est relativement loin de la surface, il n'existe aucune interaction entre la sonde et la surface de l'échantillon, le microlevier est à sa position d'équilibre. Cette zone définit la ligne de base ( $F = 0$ ). En s'approchant de la surface, des forces d'attraction électrostatiques apparaissent, le microlevier subit une déflexion négative suivie par un saut au contact (snap-on) de la sonde (Figure II.11,2). Au-delà du contact, des forces de répulsion agissent sur la sonde, la déflexion du microlevier dépend de la viscoélasticité de l'échantillon. La sonde continue à appuyer jusqu'à une force imposée par le manipulateur (Figure II.11,3). Dans cette zone, une déformation de la surface de l'échantillon est notée. De la courbe d'approche, on peut estimer différents paramètres mécaniques et élastiques de l'échantillon (module de Young, constante de raideur de l'échantillon, ...). Ces différents paramètres sont estimés en se basant sur des modèles physiques qui décrivent les différentes interactions entre la sonde et l'échantillon. Une fois que la force fixée par le manipulateur est atteinte, la sonde est éloignée de la surface (Figure II.11,4). Durant cette étape, les forces de répulsion décroissent progressivement, des forces d'attraction prennent place et maintiennent la sonde en contact avec l'échantillon. Une fois que la force qui éloigne la sonde de l'échantillon devient plus élevée que les forces attractives, un saut hors contact (snap-off) a lieu (Figure II.11,5) [184]. Après le saut hors-contact, le microlevier revient à sa position d'équilibre (Figure II.11,6). Les courbes de retrait permettent d'extraire des informations sur les forces d'interaction entre la sonde et la surface de l'échantillon durant leur séparation. Les courbes de force sont généralement enregistrées en plusieurs points de la surface de l'échantillon, créant ainsi une cartographie appelée image force-volume. L'enregistrement des cartes ou images force-volume avec un grand nombre de courbes de force permet de pallier à l'hétérogénéité des surfaces, et d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs.

#### **4.2.2. Spectroscopie de force à molécule unique (Single molecule force spectroscopy, SMFS)**

La possibilité de fonctionnaliser les sondes AFM en greffant des molécules d'intérêt à leur extrémité permet de réaliser des cartes d'adhésion spécifique à un seul type d'interaction. Dans le cas d'une sonde fonctionnalisée avec des lectines, il s'agit de cartographier la reconnaissance biomoléculaire caractéristique des interactions spécifiques de type ligand-récepteur (Figure II.12).

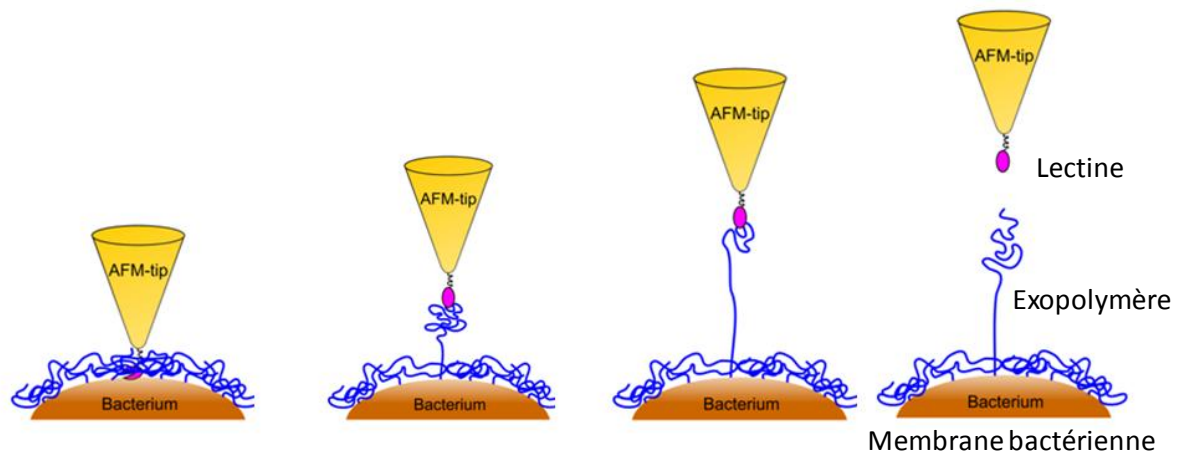


Figure II.12 : Principe de la microscopie de force atomique à molécule unique : l'interaction entre la sonde et l'échantillon se fait d'une manière spécifique entre les molécules immobilisées sur la sonde et leurs molécules cibles à la surface de l'échantillon, exemple de lectine greffée sur la sonde entrant en interaction avec un exopolymère bactérien

Ce type d'interactions est d'une grande importance dans divers processus biologiques faisant intervenir une interaction similaire (ligand-récepteur), telles que l'activité enzymatique (enzyme-substrat), la réponse immunitaire (anticorps-antigène) et d'autres fonctions cellulaires. Le développement des biocapteurs dont les applications sont analytiques et biomédicales repose sur la spécificité et la sélectivité de telles interactions [239].

C'est la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique appelée SMFS pour « Single Molecule Force Spectroscopy ». Le principe étant similaire à celui de la spectroscopie de force, de la même manière, il s'agit de suivre la déflexion du micolevier en fonction de la distance de séparation sonde/échantillon. L'exemple illustré dans la Figure II.12 montre le cas d'une sonde AFM modifiée avec une lectine. Lorsque la sonde s'approche de la surface, la lectine se lie spécifiquement à sa molécule cible. Lors de l'éloignement de la sonde, cette molécule sera étirée jusqu'à ce que la force d'étirement soit supérieure à la force d'adhésion lectine/molécule cible, à ce moment, la liaison sera rompue.

#### 4.2.3. Fonctionnalisation des sondes

Il existe différentes façons pour fonctionnaliser les sondes AFM ; cette fonctionnalisation peut être réalisée soit par adsorption chimique de molécules spécifiques sur la sonde, soit par greffage chimique via un espaceur, c'est le choix que nous avons opéré. Lors du choix de la stratégie de fonctionnalisation, il est essentiel de prendre en compte différentes

considérations : i) la force qui immobilise les lectines sur les sondes doit être plus importante que leurs forces d'adhésion à leurs molécules cibles, ii) les lectines doivent avoir un degré de liberté qui les permet d'interagir librement avec les polysaccharides de l'échantillon, ceci est assuré par l'utilisation d'un bras espaceur, dans notre cas il s'agit du NHS-PEG-acétal, iii) une densité de surface faible est recommandée pour limiter l'interaction à une interaction unique.

Le protocole de fonctionnalisation que nous avons utilisé est schématisé dans la Figure II.13, ce protocole est décrit par Hinterdorf *et al* [240]. La première étape consiste à greffer sur la sonde des groupes amines, par l'interaction de cette dernière avec une solution d'éthanolamine ( $C_2H_7NO$ ). La deuxième étape consiste à ajouter des bras espaceurs (linker) de polyéthylène glycol portants à leurs extrémités une fonction benzaldéhyde. La troisième étape permet d'ajouter la lectine d'intérêt à l'extrémité libre du linker par une liaison entre son groupe benzaldéhyde et une lysine terminale de la protéine. La fonctionnalisation d'une sonde peut entraîner une légère modification de la constante de raideur du microlevier ( $k_C$ ). Afin de pouvoir calculer avec justesse les forces d'interaction, les constantes de raideur des microleviers sont systématiquement déterminées par la méthode des fluctuations thermiques [241] après fonctionnalisation, en général juste avant les expériences.

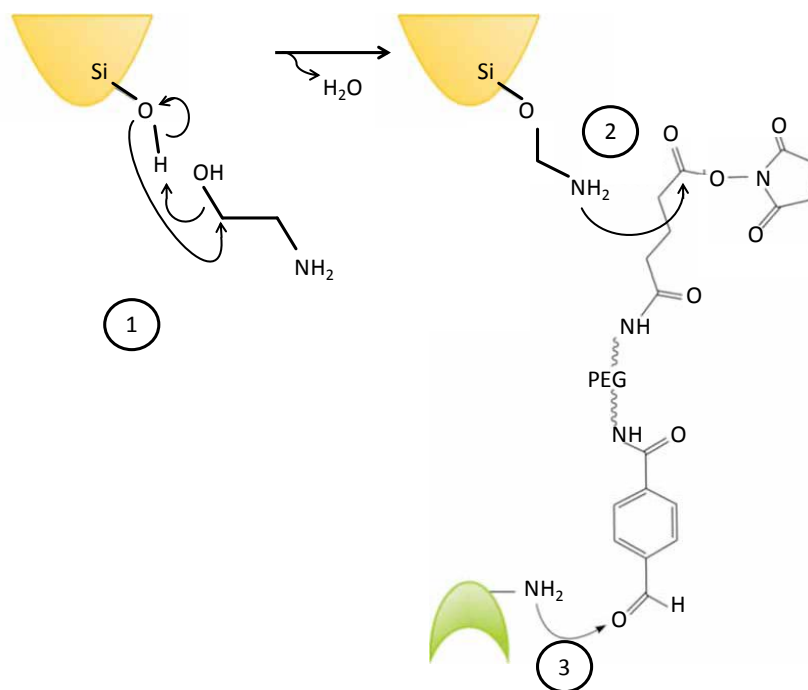


Figure II.13 : Les différentes étapes du protocole de fonctionnalisation des sondes, modifié à partir de Francius *et al.* 2006

#### 4.2.4. Modèles physiques décrivant le comportement mécanique de polymères sous étirement

L'étirement de simples molécules par une sonde AFM aboutit à des courbes de force-distance avec un comportement non linéaire. Un exemple est présenté dans la Figure II.14.

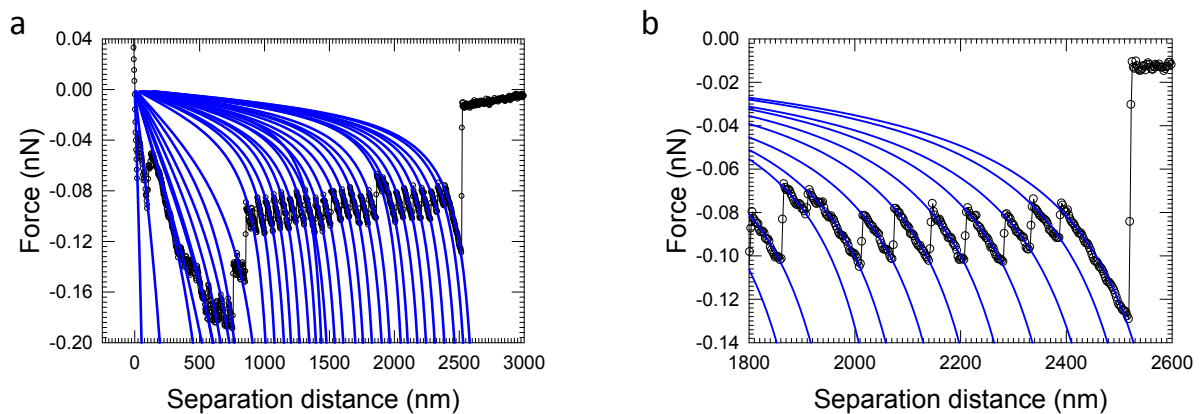


Figure II.14 : a : exemple d'une courbe de force expérimentale enregistrée en utilisant une sonde fonctionnalisée avec une lectine réalisée sur un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h, b : zoom sur une zone d'intérêt

Ces courbes de force présentent une succession de plusieurs pics qui correspondent à l'étirement d'une molécule flexible. Le dernier pic correspond à la rupture de la liaison entre la lectine greffée à la surface de la sonde et le polymère à la surface de l'échantillon, c'est la force d'adhésion. L'ensemble des courbes de force est modélisé par des modèles de la mécanique statistique qui permettent de décrire quantitativement l'élasticité de macromolécules flexibles. Le modèle de la chaîne segmentée ou modèle FJC pour « freely jointed chain » [242] et le modèle du ver ou WLC pour « worm like chain » [243] sont les modèles les plus utilisés dans ce contexte. Une représentation schématique de types de polymères décrits par ces deux modèles est présentée dans la Figure II.15.



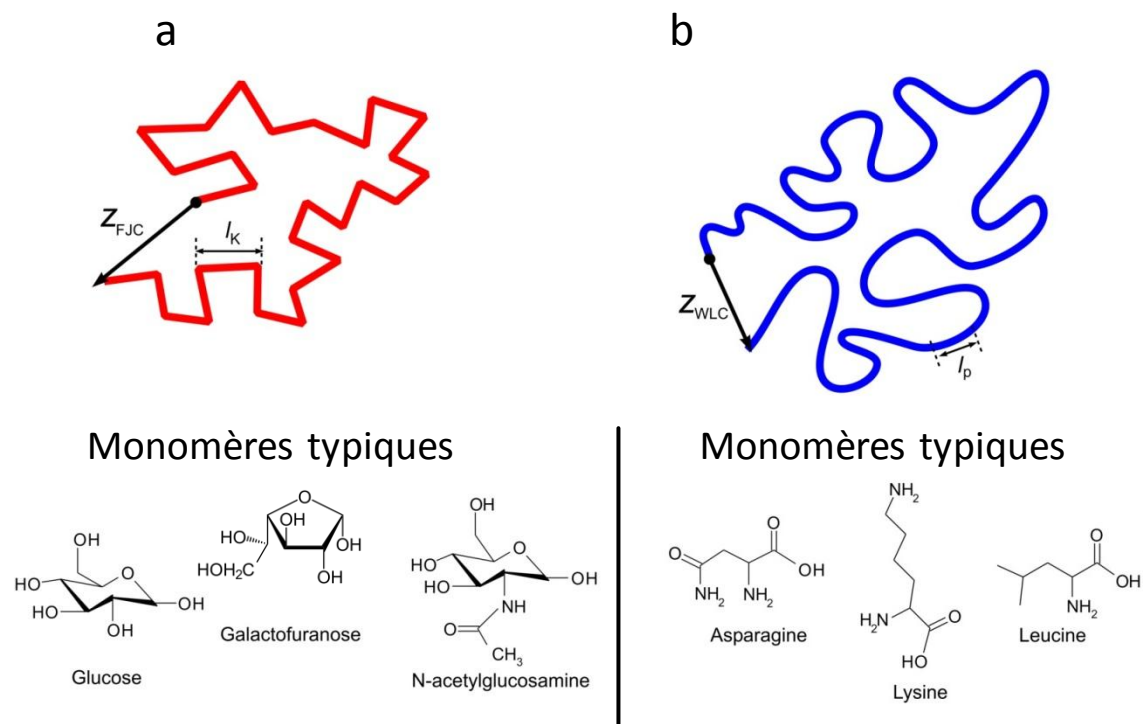


Figure II.15 : Représentation schématique de polymères décrits par (a) le modèle FJC et (b) le modèle WLC

Le modèle FJC décrit plutôt bien le comportement des polysaccharides sous étirement. Ce modèle considère un polymère comme un ensemble de segments rigides connectés entre eux par des joints flexibles et pouvant se déplacer d'une manière indépendante les uns des autres. La longueur d'un segment désignée par longueur de Kuhn ( $l_k$ ) est une mesure directe de la rigidité de la chaîne. L'extension est limitée par la longueur de contour  $L_c$ , qui correspond à la longueur linéaire de la molécule étirée sans déformation du squelette moléculaire. L'extension du polymère  $Z_{FJC}$  peut être exprimée en fonction de la force appliquée selon l'équation :

$$Z_{FJC} = -L_c \left[ \coth\left(\frac{Fl_k}{k_b T}\right) - \frac{k_b T}{Fl_k} \right] \quad \text{II-8}$$

où  $k_b$  est la constante de Boltzmann, T est la température absolue.

Le nombre de monomères N est déterminé selon l'équation :

$$N = L_c / l_k \quad \text{II-9}$$

Le modèle WLC décrit généralement le comportement des protéines. Ce modèle décrit un polymère comme étant un fil homogène d'élasticité de déformation constante, et qui est linéaire sur une longueur de persistance  $l_p$ . Ce paramètre décrit la rigidité du polymère. L'équation suivante donne une approximation de la relation entre l'extension  $z$  et la force appliquée :

$$F_{WLC} = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{z}{L_c} \right)^{-2} + \frac{z}{L_c} - \frac{1}{4} \right] \quad \text{II-10}$$

Le choix d'un modèle est guidé par le paramètre décrivant la meilleure qualité d'ajustement  $q_{\min}$ , calculé par l'équation :

$$q_{\min} = \min \left( \sum_{i=0}^n \left[ \left( 1 - \frac{F_{\text{calc}}(i)}{F_{\text{exp}}(i)} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} + \sum_{i=0}^n \left[ \left( 1 - \frac{z_{\text{calc}}(i)}{z_{\text{exp}}(i)} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \right) \quad \text{II-11}$$

où  $n$  est le nombre de points dans une courbe de force segmentée,  $F_{\text{exp}}(i)$  and  $z_{\text{exp}}(i)$  correspondent aux données expérimentales au point  $i$ ,  $F_{\text{calc}}(i)$  and  $z_{\text{calc}}(i)$  sont les valeurs estimées par le modèle théorique au point  $i$  [150, 200].

### 4.3. Préparation des échantillons

Le disque en germanium est enlevé de la cellule d'écoulement, lavé avec une solution tamponnée de PBS à pH 7,4. Le disque est ensuite collé sur une lame de verre fixée dans la cellule de mesures AFM. Les échantillons sont maintenus hydratés à tout instant avec la solution tamponnée de PBS. Dans le cas des mesures réalisées avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, l'hydratation des échantillons se fait avec une solution tamponnée d'acétate à pH 5,2 contenant des ions  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnCl}_2$ ) et  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ).

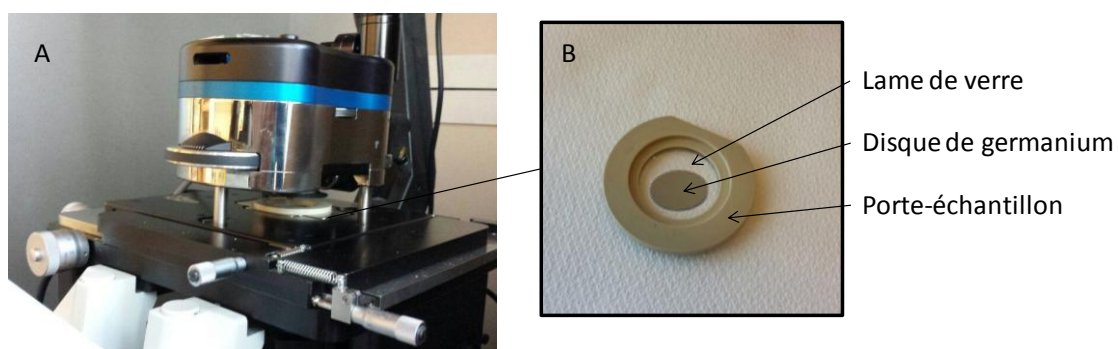


Figure II.16 : (A) : microscope à force atomique avec l'échantillon placé en dessous, (B) : disque de germanium fixé sur une lame de verre, les deux placés dans la porte-échantillon pour les analyses AFM

#### 4.4. Acquisition et traitement des données

Les mesures de force sont réalisées avec un instrument MFP3D-BIO (Mannheim, Allemagne) équipé d'un microscope inversé Olympus IX71 (Oxford instrument). Nous avons utilisé des microleviers MLCT-Au (Bruker Nano AXS, Palaiseau, France). Les sondes sont fonctionnalisées avec la ConA dans le cas des mesures réalisées sur les biofilms de *P. fluorescens* et la WGA dans le cas de celles réalisées sur les biofilms d'*E. coli*. Nous avons obtenu des valeurs de constante de raideur de la sonde ( $k_c$ ) de 10-15 pN avec la méthode des fluctuations thermiques. Les cartes de force-volume sont enregistrées en réalisant 1024 courbes de force (grille de 32 x 32) sur une surface de 20 x 20  $\mu\text{m}$ . Les vitesses d'approche et de retrait sont imposées à 10  $\mu\text{m/s}$  avec une force appliquée maximale de 200 pN. Le traitement de données est complètement automatisé. Après introduction de paramètres de référence (constante de raideur de la sonde, nombre estimé de pics, ...), un algorithme de calcul programmé sous Matlab permet de modéliser les courbes de force en se basant sur les différents modèles physiques décrits précédemment dans ce chapitre. L'algorithme de calcul est décrit par Polyakov *et al.* [200]. Le programme crée 2 dossiers : Un contenant des fichiers individuels comprenant les courbes expérimentales et les courbes d'ajustement théorique, et un dossier regroupant les fichiers comportant les résultats généraux pour chacun des modèles avec les différents paramètres physico-chimiques calculés (nombre de ruptures par courbe de force, longueur de contour  $L_c$ , forces de rupture et d'adhésion, nombre de monomères, longueur de Kuhn et de persistance  $l_k$  et  $l_p$ ).courbe par courbe et pic par pic. Les données sont ensuite importées dans un tableur graphique (SigmaPlot) pour la représentation des courbes de force et des distributions statistiques des différents paramètres

**Chapitre III**  
**Etude des signatures Raman de**  
***Pseudomonas fluorescens* et**  
***Escherichia coli* à l'état**  
**planctonique**



Les signatures spectroscopiques fournies dans les spectres infrarouge et Raman constituent un profil chimique complet et hautement spécifique d'un échantillon [244, 245], ils en reflètent la composition moléculaire totale [245]. Les spectres vibrationnels sont souvent utilisés pour la caractérisation des échantillons biologiques. Cependant, la complexité de ces échantillons et le nombre important de vibrations possibles font que l'interprétation des données spectroscopiques est toujours très délicate. Les profils spectraux de cellules bactériennes sont influencés par un grand nombre de facteurs comme par exemple les conditions et la phase de croissance et la préparation de l'échantillon. Le contrôle de ces divers paramètres est essentiel pour toute étude spectroscopique [245]. Afin de pouvoir utiliser les spectres pour l'évaluation de l'état physiologique de bactéries dans un biofilm, la compréhension de la signature vibrationnelle de bactéries est nécessaire.

Ce chapitre sera ainsi dédié à l'interprétation des signatures vibrationnelles des deux modèles bactériens de cette étude *P. fluorescens* et *E. coli* à l'état planctonique. Dans un premier temps, une étude détaillée de la signature Raman sera présentée et les attributions des différentes bandes Raman seront discutées. Dans un deuxième temps, les spectres Raman de *P. fluorescens* et *E.coli* sous forme planctonique récoltées à différents temps de croissance serviront pour l'extraction des informations relatives à l'état physiologique bactérien en fonction des stades de croissance.

## **1. Signature Raman de *Pseudomonas fluorescens* et d'*Escherichia coli* sous forme planctonique**

Avant d'entamer une étude approfondie des signatures Raman de *P. fluorescens* et d'*E. coli*, il est nécessaire d'examiner la signature Raman du support utilisé au cours de cette étude, à savoir un cristal de germanium, puisque celle-ci peut selon les conditions se superposer à celle des des échantillons bactériens. La Figure III.1 présente les spectres du support en germanium enregistrés respectivement avec un laser émettant à une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) de 514 et de 530 nm.

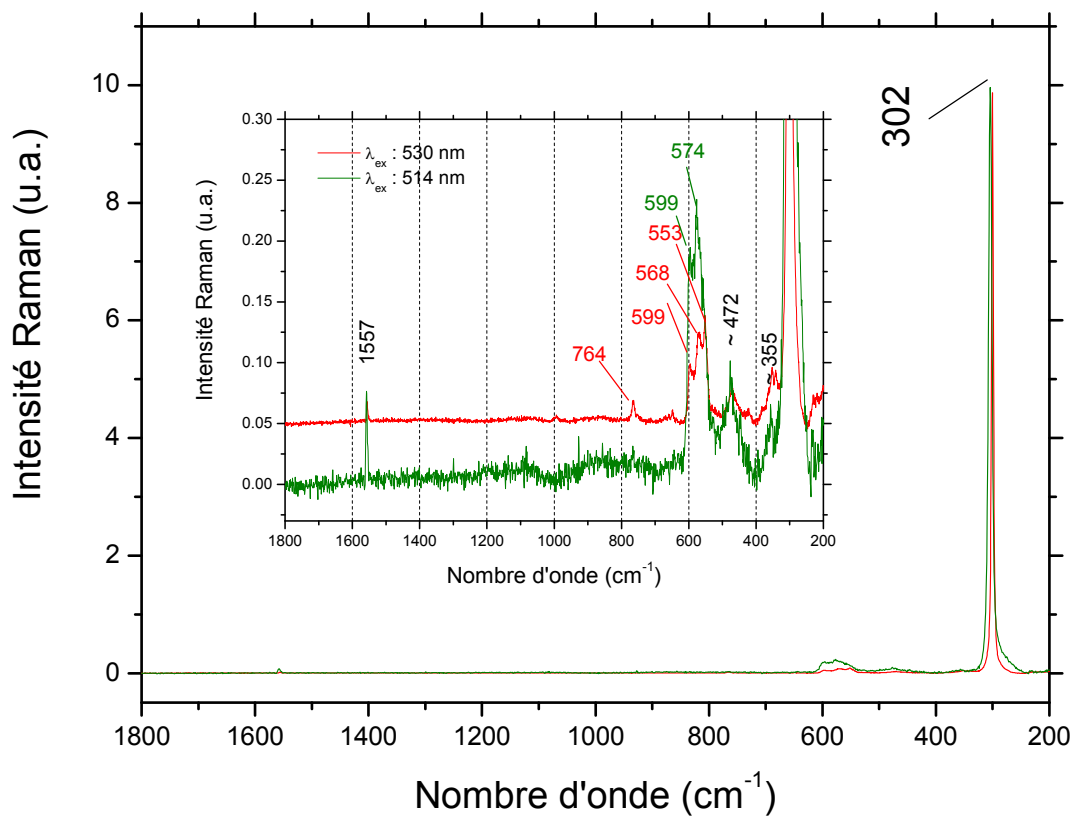


Figure III.1 : Spectres Raman de deux supports en germanium enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) respectivement de 514 (réseau à 1200 traits) et 530 nm (réseau à 1800 traits). Les spectres sont normés par rapport à la bande à 302  $\text{cm}^{-1}$ . Encart : agrandissement des bandes de faible intensité

Le spectre du support en germanium présente une bande intense à 302  $\text{cm}^{-1}$ , et d'autres bandes de plus faible intensité à 599, 574 et 472  $\text{cm}^{-1}$  avec une longueur d'onde d'excitation de 514 nm, et à 764, 599, 568 et 553  $\text{cm}^{-1}$  à 530 nm. Les pics à 574 et 553  $\text{cm}^{-1}$  pour une longueur d'onde d'excitation de 514 et 530 nm respectivement et celui à 302  $\text{cm}^{-1}$  sont associées aux phonons du germanium [246], c'est-à-dire aux vibrations de son réseau cristallin, celle à 470  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux oxydes de Germanium qui se forment à la surface [247]. La bande à 1557  $\text{cm}^{-1}$  est associée à la vibration du dioxygène à la surface du Germanium [248]. Ces deux exemples (Figure III.1) illustrent que le profil spectral peut varier selon l'endroit analysé, a priori indépendamment de la longueur d'excitation. En effet, le profil des pics liés aux oxydes de surface peut varier avec notamment le taux d'hydroxylation de la surface. Le profil de la bande à 574  $\text{cm}^{-1}$  peut également changer en fonction des défauts locaux de cristallisation et de la direction de l'onde incidente laser par

rapport aux axes cristallographiques locaux. D'où l'impossibilité de soustraire des spectres bactériens un spectre de référence du support en germanium. Les bandes dues au support sont majoritairement en dessous de  $600\text{ cm}^{-1}$ , l'analyse de cette zone sur les spectres bactériens doit se faire avec une grande prudence.

La Figure III.2 présente les spectres Raman de culots de *P. fluorescens* et d'*E. coli* en fin de phase exponentielle. Ces spectres ont été enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Les tentatives d'attribution des bandes principales sont indiquées sur la figure.

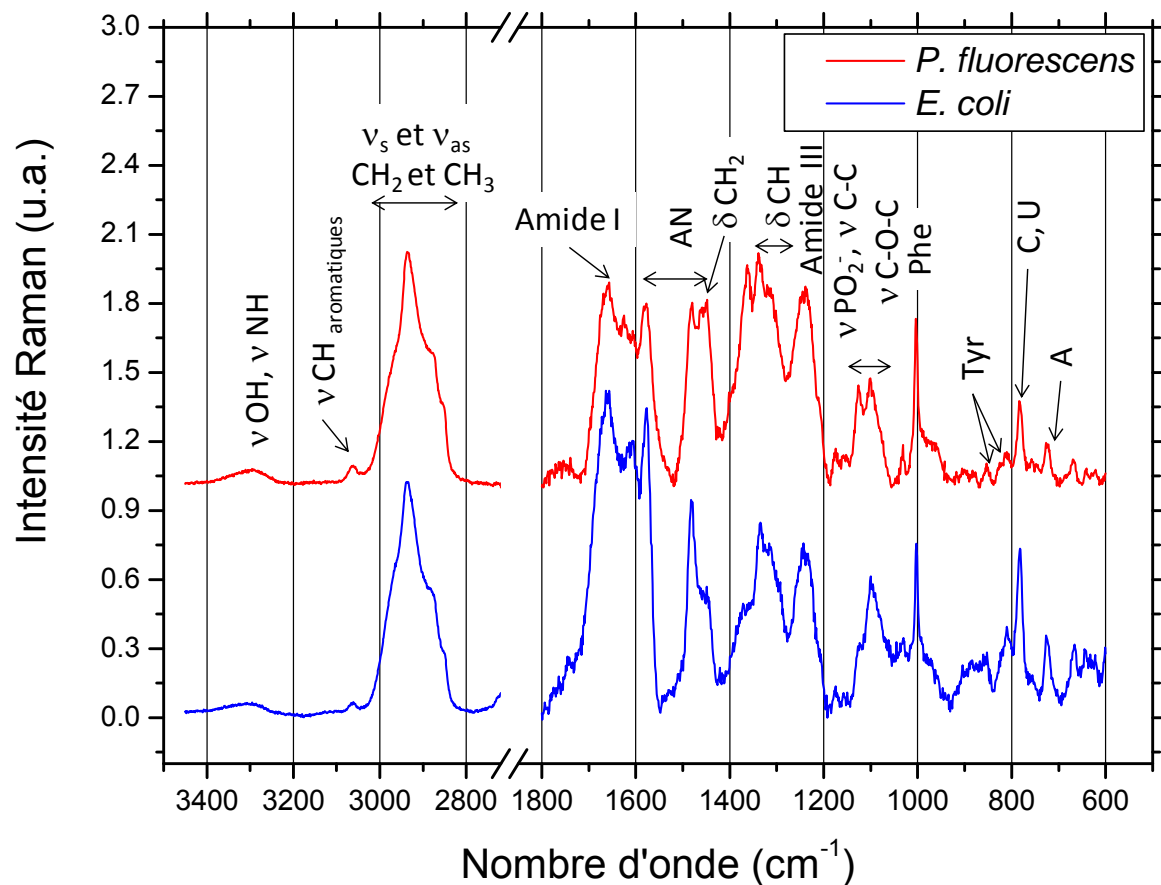


Figure III.2 : Spectres Raman de culots partiellement hydratés de bactéries *P. fluorescens* (en haut) et *E. coli* (en bas) planctoniques collectées en phase exponentielle, les spectres sont normés par rapport à la bande à  $1003\text{ cm}^{-1}$  de la phénylalanine,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 488nm, (C : cytosine, A : adénine, U : uracile, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, AN : acides nucléiques,  $\nu$  : vibration d'élongation,  $\delta$  : vibration de déformation), réseau à 1200 traits.



On peut y distinguer les quatre grandes familles de biomolécules suivantes.

### **Acides nucléiques :**

Les bandes caractéristiques des acides nucléiques correspondent principalement aux vibrations de leurs bases et des groupements phosphates. Les bandes principales des vibrations des groupements phosphates sont l'élongation symétrique des groupes  $\text{PO}_2^-$  aux alentours de  $1095 \text{ cm}^{-1}$  [170, 249], et l'élongation O-P-O à  $813 \text{ cm}^{-1}$  (ARN) et  $788 \text{ cm}^{-1}$  (ADN) [250]. Parmi les bandes caractéristiques des bases, on distingue la bande à  $1575 \text{ cm}^{-1}$  attribuée à la guanine et l'adénine [245, 250, 251], la bande à  $780 \text{ cm}^{-1}$  attribuée à la respiration du cycle de la cytosine, à l'uracile [245, 249] et à la f3thymine [250], ainsi que la bande à  $720 \text{ cm}^{-1}$  attribuée à la respiration du cycle de l'adénine [245]. La bande aux alentours de  $1480 \text{ cm}^{-1}$  est également attribuée aux vibrations des acides nucléiques [169, 170, 250].

### **Polysaccharides :**

Les polysaccharides montrent des bandes dans trois régions différentes du spectre Raman des bactéries : i) la région entre  $1500$  et  $1200 \text{ cm}^{-1}$  qui correspond aux vibrations de déformations  $\text{CH}/\text{CH}_2$ , ii) la région située entre  $1200$  et  $950 \text{ cm}^{-1}$  contenant des bandes attribuées aux vibrations d'élongations C-C, aux vibrations de la liaison osidique et aux modes de respiration des cycles, iii) et la région située entre  $950$  et  $700 \text{ cm}^{-1}$  dont les bandes sont attribuées aux vibrations de déformations de groupes fonctionnels latéraux (C-O-H, C-C-H et O-C-H) [251, 252]. On trouve également des bandes de vibration des liaisons carbonyle  $\text{C}=\text{O}$  et des groupes carboxyliques  $\text{COO}^-$  situées respectivement à  $\sim 1735$  et  $1400 \text{ cm}^{-1}$  [251, 252]. Des bandes en dessous de  $600 \text{ cm}^{-1}$  ont été également décrites dans la littérature : les vibrations de déformations C-O-C des cycles glucidiques entre  $540$  et  $530 \text{ cm}^{-1}$  [245, 251]. La bande associée aux vibrations d'élongation  $\text{CH}_2$  est centrée aux alentours de  $2910 \text{ cm}^{-1}$  [245].

### **Protéines :**

La bande Amide I autour de  $1650 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée à un ensemble de vibrations : élongations  $\text{C}=\text{O}$  (70-80%), élongations C-N (10-30%) et déformation N-H [251]. La bande amide III située entre  $1280$  et  $1200 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux élongations C-N (40%), déformation N-H (30%) et déformation C-H [251]. Ces bandes sont sensibles à la structure secondaire des protéines [250, 253]. Les bandes de vibrations d'élongations C-H sont à  $2930 \text{ cm}^{-1}$  avec deux épaulements à  $2970$  et  $2875 \text{ cm}^{-1}$  respectivement [245]. Le profil spectral des élongations CH

dans nos spectres est assez proche de celui des protéines seules, mais avec un épaulement vers  $2850\text{ cm}^{-1}$  caractéristique des élongations  $\text{CH}_2$  dans les lipides [245].

Des bandes caractéristiques des acides aminés spécifiques sont distribuées dans le spectre :

- i) La phénylalanine présente différentes bandes, essentiellement les bandes à  $1003$  et  $623\text{ cm}^{-1}$ , ces bandes correspondent à la respiration du cycle aromatique [245]. Une contribution des vibrations (C-H) de phénylalanine aux bandes à  $1339$ ,  $1175$  et  $1030\text{ cm}^{-1}$  [254], et des vibrations C=C à la bande à  $1605\text{ cm}^{-1}$  [251] est rapportée.
- ii) La tyrosine présente une bande à  $643\text{ cm}^{-1}$ , cette bande est attribuée à la respiration du cycle aromatique, une bande à  $1615\text{ cm}^{-1}$  est partiellement attribuée à cette vibration [251]. Un doublet associé à la tyrosine est à  $851$  et  $829\text{ cm}^{-1}$  [251], le rapport des intensités de ces deux bandes ( $I_{829}/I_{851}$ ) est associé à l'état du groupe hydroxyle des phénols [245, 254]. Un rapport supérieur à un est généralement associée avec des tyrosines enterrées dans la protéine et reflète un état organisé des protéines [254].
- iii) les bandes  $760\text{ cm}^{-1}$  et à  $728\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées à la respiration du cycle aromatique du tryptophane [250, 251].

### **Lipides :**

On distingue différentes bandes de lipides, notamment les vibrations d'élongation  $\text{CH}_2$  aux alentours de  $2880$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$ , de déformation  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}$  vers  $1450$  et  $1300\text{ cm}^{-1}$  [245, 255]. Les bandes de vibration C=O des esters apparaissent dans la région de  $1750$  à  $1730\text{ cm}^{-1}$  [245, 251]. La vibration d'élongation symétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$  est vers  $1090\text{ cm}^{-1}$ , cette bande est dominée par les contributions des acides nucléiques et des polysaccharides.

Les différentes attributions sont résumées dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 : tentatives d'attributions des bandes Raman dans les spectres de *P. fluorescens* et d'*E. coli* ( $\nu$  : vibration d'élongation,  $\delta$  : vibration de déformation, PL phospholipides, A.G. acides gras, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, Trp : tryptophane, A : adénine, C : cytosine, G : guanine, T : thymine, U : uracile, ARN : acide ribonucléique, ADN : acide désoxyribonucléique, ar : aromatique, ép : épaulement, sq : squelettique, conf : conformation)

		Attributions			
<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	Polysaccharides	Protéines	Acides nucléiques	Lipides
~3300	~3300	$\nu$ OH	$\nu$ OH, $\nu$ NH <sup>[256]</sup>	$\nu$ OH	
3061	3061		$\nu$ CH <sub>ar</sub> <sup>[245, 257]</sup>		
2964 (ép)	2963 (ép)		$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub> <sup>[257]</sup>		$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub> <sup>[245, 257]</sup>
2937	2935		$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub> , $\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> <sup>[245, 257]</sup>		$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub> , $\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> <sup>[245, 257]</sup>
2879	2873		$\nu_s$ CH <sub>3</sub> , $\nu_s$ CH <sub>2</sub> <sup>[245, 257]</sup>		
2850	2854				$\nu_s$ CH <sub>2</sub> <sup>[245, 257]</sup>
1745					$\nu > C = O$ (esters, PL, A.G. estérifiés) <sup>[245, 250, 256, 258, 259]</sup>
1657	1657		$\nu C = O$ (amide I) <sup>[245, 256, 257]</sup>		$\nu C=C$ <sup>[260]</sup>
	1625		$\nu C=C$ (aromatiques) <sup>[256, 257]</sup> , (Tyr, Trp) <sup>[245, 250]</sup>		
1608	1607		$\nu C=C$ (aromatiques) <sup>[256, 257]</sup> $\nu C=C$ (Phe) <sup>[245, 255]</sup> ,		

			(Tyr) <sup>[250]</sup>		
1576	1577			$\nu_{(\text{cycle})} \text{G, A}$ <sup>[245, 251]</sup>	
1482	1480		$\delta \text{CH}_2$ <sup>[256]</sup>	(G, A) <sup>[245]</sup>	
1448	1452	$\delta \text{CH}_2$ <sup>[245, 251, 257]</sup>	$\delta \text{CH}_2$ <sup>[245, 256, 257]</sup>		$\delta \text{CH}_2$ <sup>[245, 256, 257]</sup>
1372	1363	$\delta \text{CH}_2$ <sup>[256]</sup> , $\nu_s \text{COO}^-$ <sup>[251]</sup>	$\delta \text{CH}_2$ <sup>[256]</sup>		$\delta \text{CH}_2$ <sup>[256]</sup>
1335	1339	$\delta \text{CH}$ <sup>[162, 255, 260]</sup>	$\delta \text{CH}$ <sup>[162, 250, 255, 260]</sup>	A, G <sup>[250]</sup>	
1330-1300	1300-1300	$\delta \text{CH}$ <sup>[245, 250]</sup>	$\delta \text{CH}$ <sup>[245, 250, 260]</sup> $\delta \text{CH}_2$ (dans le plan) <sup>[256]</sup> , $\delta \text{OH}$ <sup>[256]</sup>	G <sup>[250]</sup>	$\delta \text{CH}_2$ <sup>[245]</sup>
1260-1210	1260-1210		Amide III <sup>[245, 256]</sup>	A, G, U, C <sup>[245, 261]</sup>	
1175	1174		$\delta \text{CH}$ (Tyr) <sup>[250]</sup>		
~1150	~1150	$\delta \text{COH}$ <sup>[257]</sup>	$\nu \text{CC}$ , $\nu \text{CN}$ <sup>[250]</sup>		
1125	1126	$\nu \text{CC}$ <sup>[245, 257]</sup> $\nu_s \text{COC}$ <sup>[256]</sup>	$\nu \text{CC}$ , $\nu \text{CN}$ <sup>[245, 250]</sup>		$\nu \text{CC}$ <sup>[245, 257]</sup>
1110-1060	1110-1060	$\nu_{\text{as}} \text{COC}$ , $\nu \text{CO}$ , $\nu \text{CC}$ , $\delta \text{COH}$ , $\delta \text{CH}$ <sup>[245, 250, 251, 257]</sup>	$\nu \text{CN}$ <sup>[245, 251]</sup>	$\nu_s \text{PO}_2^-$ <sup>[245, 257]</sup>	$\nu_{\text{as}} \text{CC}_{\text{sq}}$ <sup>[250, 257]</sup> $\nu_s \text{PO}_2^-$ <sup>[245, 257]</sup>
1031	1031		$\delta \text{CH}$ (dans le plan, Phe) <sup>[250, 251]</sup>		$\nu \text{CC}_{\text{sq}}$ <sup>[257]</sup>
1003	1004		$\delta \text{CH}$ (dans le plan, Phe), $\nu \text{CC}_{\text{cycle ar}}$ (Phe) <sup>[250, 256]</sup> ,		

			<sup>257]</sup>		
860-940	860-940	$\nu$ CC, $\nu$ COC (1-4), $\delta$ COH, $\delta$ CH <sup>[245, 251, 256, 257]</sup>			$\nu_s$ C-C-N <sup>+</sup> <sup>[250]</sup>
853	853		Tyr enfoui <sup>[245]</sup> , $\nu$ CC <sub>cycle</sub> <sup>[250, 257]</sup>		
824	825		Tyr exposé <sup>[245]</sup> , $\delta$ CCH <sup>[257]</sup>	$\nu_{as}$ O-P-O <sup>[250]</sup>	
810	810			$\nu$ O-P-O (ARN) <sup>[250]</sup>	
783	784			$\nu$ O-P-O (ADN) <sup>[250]</sup> (C, U) <sup>[245]n</sup> T <sup>[250]</sup>	
727	727		Trp <sup>[250, 251]</sup>	$\delta$ CH <sub>2</sub> <sup>[257]</sup> , A <sup>[245, 250]</sup>	
666	670		$\nu$ CS <sup>[257]</sup>	T, G <sup>[245, 250]</sup> ,	
645	641		$\delta$ NCO <sup>[257]</sup> , $\delta$ CC (Tyr) <sup>[245, 250]</sup>		
623	622		$\delta$ NCO <sup>[257]</sup> $\delta$ CC (Phe) <sup>[245, 250]</sup>		

## 2. Variation de la signature Raman des bactéries *P. fluorescens* planctoniques en fonction de la longueur d'onde d'excitation

Comme le montre la Figure III.3 la signature Raman des bactéries *P. fluorescens* planctoniques peut toutefois varier en fonction de la longueur d'onde d'excitation utilisée.

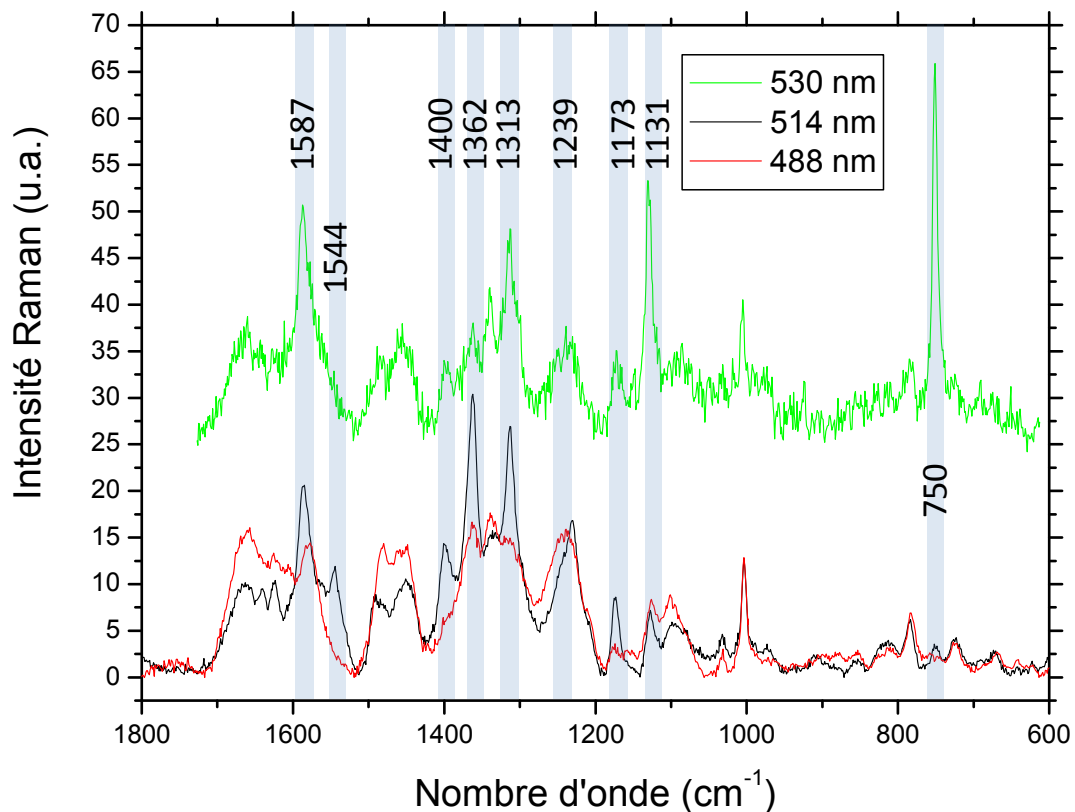


Figure III.3 : Signatures spectrales Raman d'un culot de bactéries *P. fluorescens* planctoniques aux longueurs d'onde d'excitation 488, 514 (réseau à 1200 traits) et 530 nm (réseau à 600 traits). Les bactéries ont été collectées en phase exponentielle et les spectres sont normés par rapport au pic à 1003 cm<sup>-1</sup> attribué à la phénylalanine.

A la longueur d'onde d'excitation de 514 nm, le spectre est dominé par 9 fines bandes intenses qui se superposent au profil spectral précédent obtenu à 488 nm. Ces bandes sont centrées à 1585, 1544, 1400, 1362, 1313, 1230, 1174, 1128 et 750 cm<sup>-1</sup>. Une grande partie de celles-ci se retrouvent également sur le spectre acquis à 530 nm mais avec des intensités relatives différentes.

L'apparition de tels pics fins dans la signature Raman de certaines bactéries a déjà été reportée dans la littérature. Par exemple Harz *et al.* [162] notent que le spectre Raman à 532 nm d'une culture de *S. cohnii* DSM 6669 présente trois bandes intenses à 746, 1125 and 1575  $\text{cm}^{-1}$  mais sans conclure sur l'origine de celles-ci. Sandt *et al.* [170] reportent que la signature Raman à 514 nm des biofilms de *P. aeruginosa* se distingue par l'apparition de cinq bandes fines (1310, 1360, 1400, 1545 et 1585  $\text{cm}^{-1}$ ) dominant les spectres et qui disparaissent suite au lavage à l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique). Ils en ont alors déduit que ces bandes appartenaient aux EPS mais sans les attribuer précisément. De même Pradhan *et al.* ont reporté une signature similaire dans les spectres à 524 nm de biofilms d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* qu'ils ont associée également aux EPS [216]. Les biofilms et les cultures planctoniques de *Nitrosomonas communis* [164], *Nitrosomonas europaea* [164, 174], *Nitrobacter hamburgensis* DSM 10229, candidat *Brocadia anammoxidans* [163, 174], et *Geobacter* [177] présentent aussi des signatures Raman similaires à 532nm.

### **2.1. Attribution des bandes intenses dans les signatures bactériennes de *P fluorescens* à 514 et 530 nm**

Ce type de signature Raman intense et fine peut faire évoquer un éventuel effet Raman de résonance provenant de l'un des composants bactériens. Comme le montre la Figure III.4 cette signature Raman fine correspond en effet au Raman de résonance du cytochrome *c*.

Le cytochrome *c* est une protéine à hème de la chaîne respiratoire mitochondriale et de celle de la plupart de bactéries [262, 263]. Le cytochrome *c* joue également un rôle dans l'initiation de l'apoptose [264]. Il a été extrait de *P. fluorescens* pour la première fois en 1953 par Lenhoff *et al.* [265].

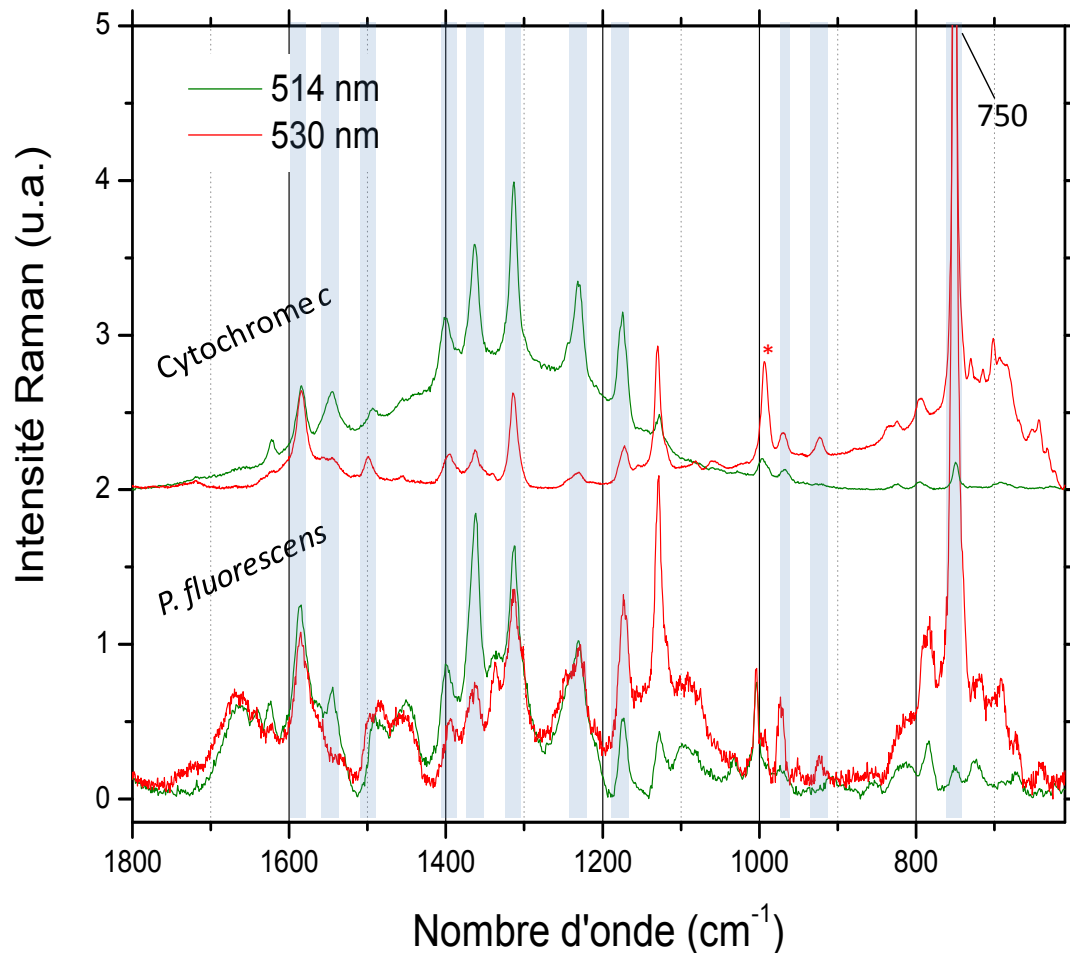


Figure III.4 : Spectres Raman du cytochrome *c* bovin et d'un culot de bactéries *P. fluorescens* planctoniques en phase exponentielle,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 (vert), 530 (rouge), réseau à 1800 traits (sauf pour le spectre du cytochrome *c*,  $\lambda_{\text{ex}}$  514 nm, réseau à 1200 traits), \* : sel présent dans le solvant

La Figure III.5 montre la structure de l'hème du cytochrome *c*. L'hème consiste en un groupement protoporphyrine IV contenant un atome de fer central. Les chaînes latérales vinyle de l'hème *c* sont liées par covalence à deux résidus de cystéine (Cys 14 et Cys 17) de la protéine. L'atome de fer central possède deux ligands axiaux aux quatrième et cinquième positions de coordination : His18 et Met80 [263, 266]. Selon l'état d'oxydation du fer central, le cytochrome *c* est dit sous forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou sous forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [266].



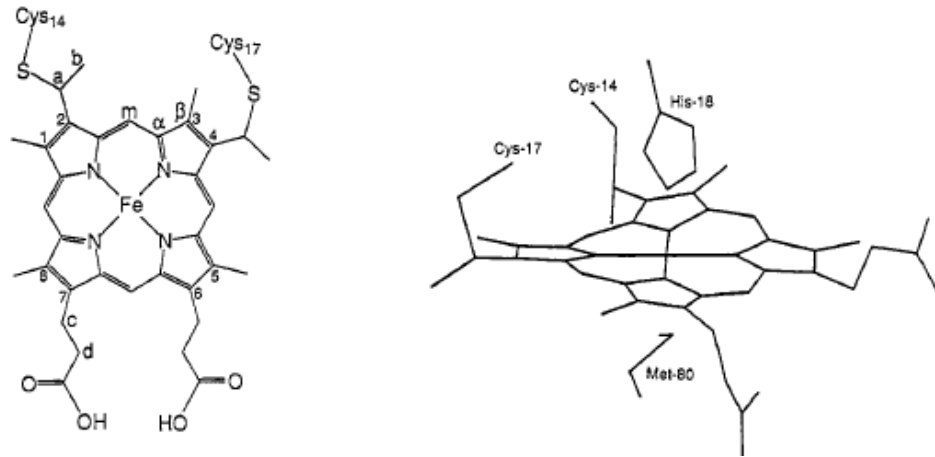


Figure III.5 : Structure de l'hème du cytochrome *c* (extrait à partir de Hu *et al.* [266])

Compte tenu de sa structure, le cytochrome *c* présente la propriété d'absorber le rayonnement UV-visible à certaines longueurs d'onde comme l'illustre la Figure III.6.

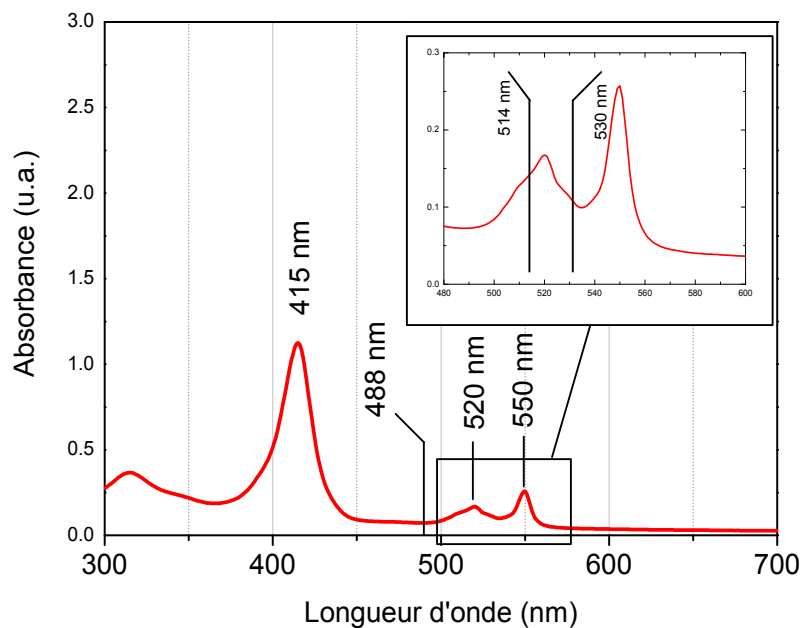


Figure III.6 : spectres UV-Visible du cytochrome *c* bovin sous forme réduite

Ce spectre montre une bande intense (bande B ou Soret) à 415 nm et deux bandes à 520 et 550 nm de faible intensité notées  $Q_{00}$  et  $Q_{01}$  (ou bandes  $\alpha$  et  $\beta$ ). Le spectre UV-Visible du

cytochrome *c* de *P. fluorescens* est identique à celui du cytochrome *c* animal [267, 268]. Une conséquence importante de cette absorption UV-visible est l'exaltation de l'intensité Raman de certains modes vibrationnels du cytochrome *c* lorsque la longueur d'onde d'excitation utilisée est proche de la longueur d'onde d'une des transitions électroniques UV-visible comme par exemple 514 et 530nm. Il s'agit de l'effet Raman de résonance. Les modes vibrationnels exaltés et l'intensité de cette exaltation diffèrent selon la longueur d'onde d'excitation [274] comme l'illustre la Figure III.7.

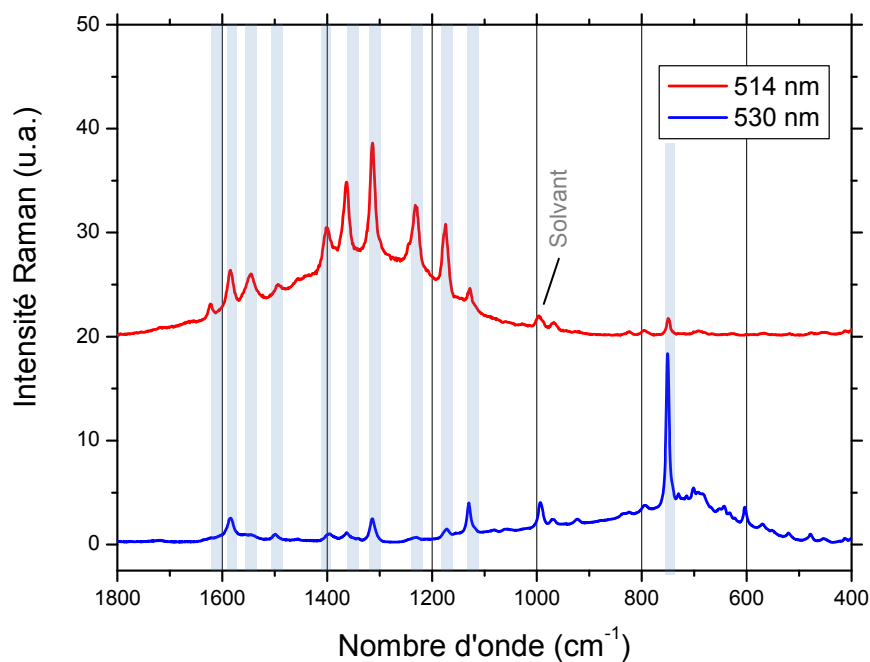


Figure III.7 : Spectres Raman du cytochrome *c* (forme réduite) de cœur de bœuf obtenus respectivement à 514 (en haut, réseau à 1200 traits) et 530 nm (en bas, réseau à 1800 traits)

Quant aux spectres Raman d'*E. coli* ils ne présentent aucunement la signature du cytochrome *c* comme le montre la Figure III.8. *E. coli* n'exprime pas en effet le cytochrome *c* dans sa chaîne respiratoire [269], ou tout au moins ne le synthétise pas à des quantités détectables dans des conditions de croissance en aérobie [262].

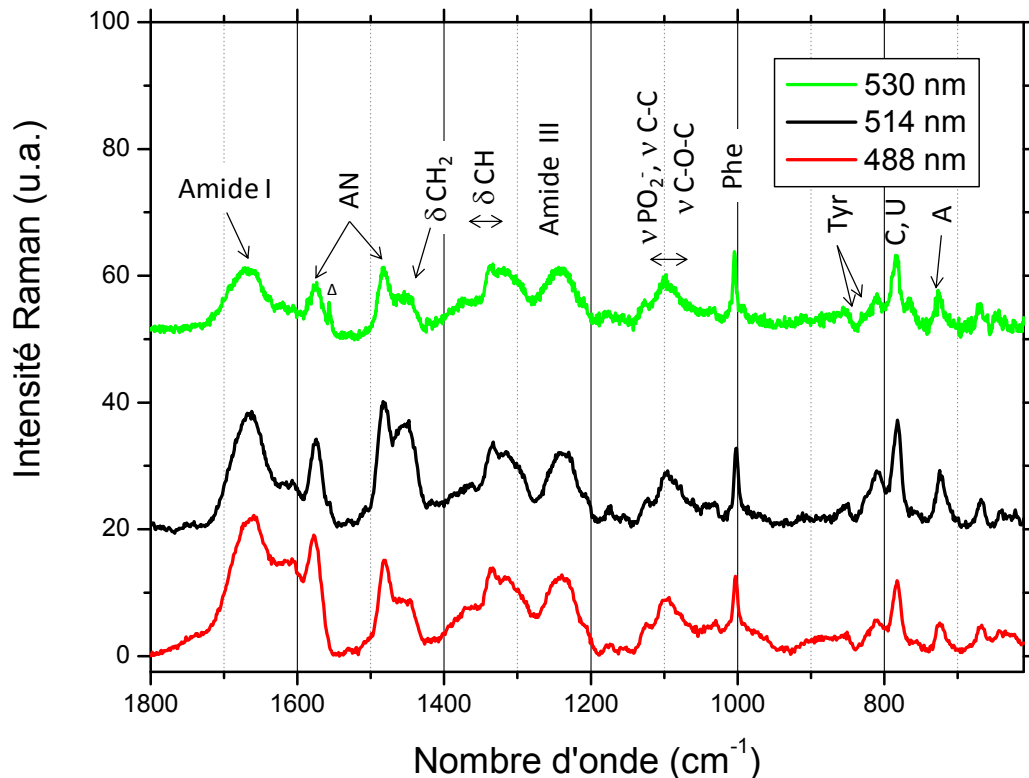


Figure III.8 : Spectres Raman d'un culot partiellement hydraté de bactéries *E. coli* planctoniques collectées en phase exponentielle,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 488 (rouge, en bas, réseau à 1800 traits), 514 (noir, au milieu, réseau à 1200 traits) et 530 nm (vert, en haut, réseau à 1800 traits). Les spectres sont normés par rapport à la bande de phénylalanine à  $1003 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\Delta$  : vibration de l' $\text{O}_2$

A notre connaissance, la signature Raman du cytochrome *c* dans la région des vibrations C-H n'est pas rapportée dans la littérature. Nous avons enregistré le signal Raman du cytochrome *c* dans cette région spectrale afin d'étudier toute contribution éventuelle aux spectres Raman de bactéries. La Figure III.9 montre les spectres du cytochrome *c* ( $\lambda_{\text{ex}}$  514 nm) et de *P. fluorescens* à 19 h ( $\lambda_{\text{ex}}$  514 nm) et 26j de culture (excitatrices à 514 et 488 nm).

On note dans le spectre du cytochrome *c*, outre les bandes de vibrations C-H, la présence de deux bandes à  $3171$  et  $3130 \text{ cm}^{-1}$  qui pourraient être attribuées aux élongations des N-H associés [33, 253]. Ces bandes sont repérables dans certains spectres de *P. fluorescens* enregistrés avec une longueur d'onde de 514 nm et sont absentes dans les spectres enregistrés à 488 nm. Dans les spectres de *P. fluorescens*, ces deux bandes peuvent être attribuées au cytochrome *c*.

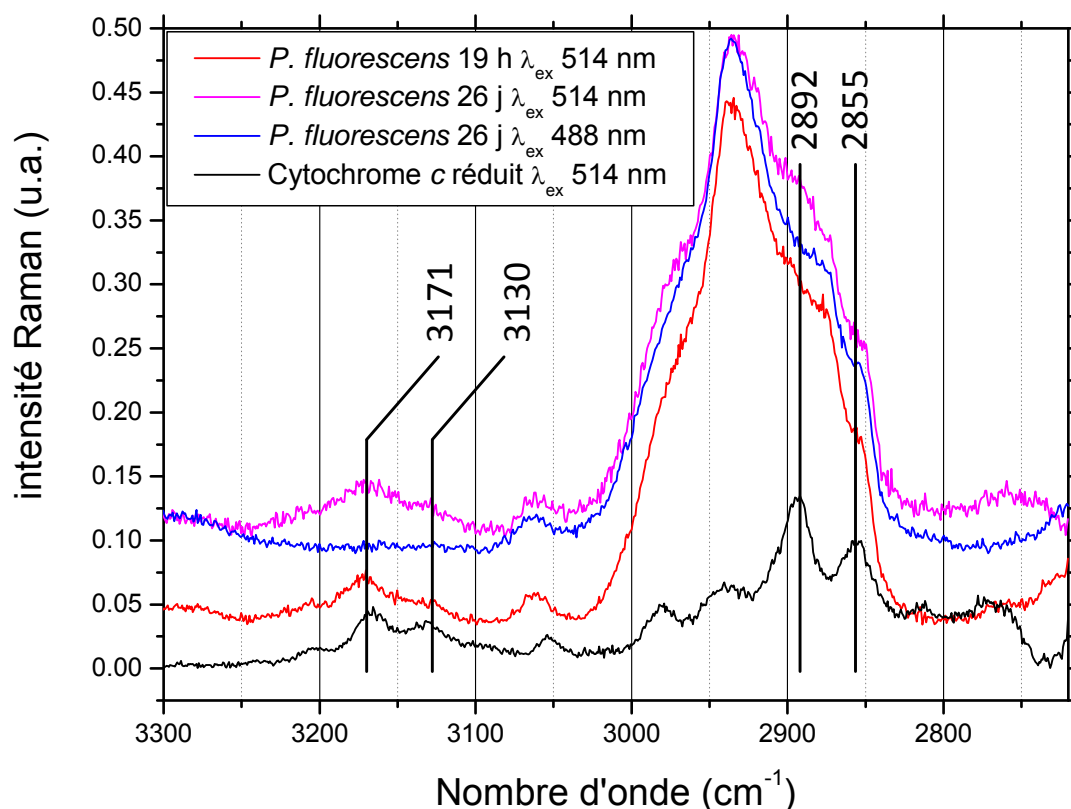


Figure III.9 : Région des vibrations CH des spectres Raman de cytochrome *c* ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm) et de culots bactériens de *P. fluorescens* en phase exponentielle (19 h de croissance,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm) et en phase de déclin (26 j de croissance,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 488 et 514 nm), réseau à 1200 traits

## 2.2. Confirmation de la signature du cytochrome *c* par Raman polarisé

Jusqu'à présent, l'attribution des bandes intenses observées dans les spectres Raman de bactéries exprimant le cytochrome *c* a été faite en s'appuyant uniquement à la similarité des profils spectraux. Cependant, comme nous l'avons vu, les bandes de cytochrome *c* chevauchent celles des composants cellulaires. Pour confirmer sans ambiguïté l'attribution de la signature observée, nous avons analysé l'état de polarisation des différentes bandes. Les bandes à 1584, 1400, 1313 et 1132  $\text{cm}^{-1}$  devaient présenter une polarisation inverse, c'est-à-dire que pour ces bandes, quand la lumière incidente est polarisée perpendiculairement à la direction de diffusion, la lumière diffusée à 90° se trouve polarisée perpendiculairement à la polarisation de la lumière incidente. Expérimentalement, ceci se traduit par un rapport de dépolarisation qui tend vers l'infini, les bandes étant beaucoup plus intenses sous une polarisation perpendiculaire de la lumière incidente que sous une polarisation parallèle. La

Figure III.10 montre les spectres d'un culot bactérien de *P. fluorescens* et du cytochrome *c* du cœur de boeuf sous polarisations perpendiculaire et parallèle.

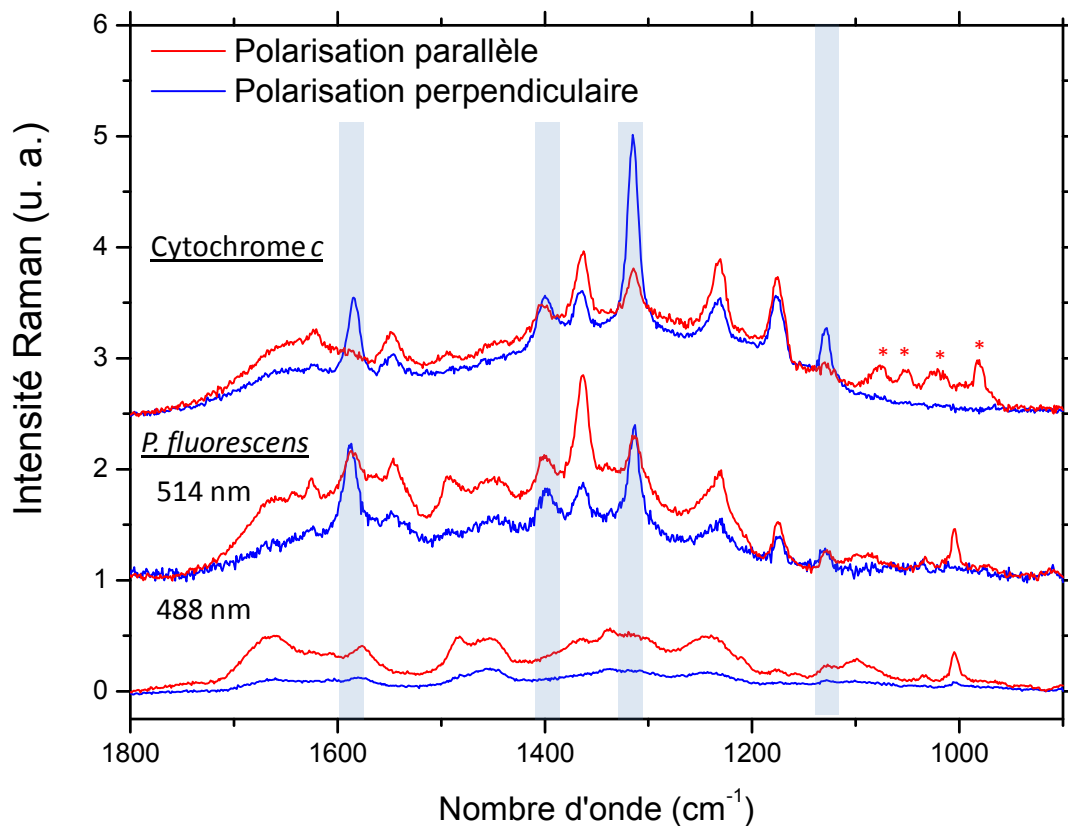


Figure III.10 : Spectres Raman polarisés d'un culot semi-hydraté de *Pseudomonas fluorescens* ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 et 488 nm) et de cytochrome *c* du cœur bovin. Les bandes sur fond gris sont les bandes présentant une polarisation inverse, réseau à 1200 traits, \* : bandes du solvant

Comme le montre la Figure III.10 les bandes à 1585 et 1313  $\text{cm}^{-1}$  sont inversement polarisées comme prévue, mais les rapports de leurs intensités sous une polarisation perpendiculaire et parallèle respectivement ( $I_{\perp}/I_{\parallel}$ ) sont inférieurs à ceux dans le cas du cytochrome *c*, toutes les autres bandes paraissent polarisées ( $I_{\perp}/I_{\parallel} < 3/4$ ) sauf les deux à 1400 et 1175  $\text{cm}^{-1}$  qui paraissent dépolarisées ( $I_{\perp}/I_{\parallel} = 3/4$ ). Ces différences par rapport à la signature du cytochrome *c* peuvent provenir de la contribution de la diffusion Raman normale des composants bactériens dont le signal Raman sera atténué sous polarisation perpendiculaire de la lumière incidente ou/et d'une symétrie plus faible du hème contenu dans le cytochrome de *P. fluorescens*. Ceci est confirmé par les résultats de ce test à 488 nm qui montre une nette

diminution de l'intensité de la signature de *P. fluorescens* sous une polarisation perpendiculaire.

Cette étude montre l'importance du choix de la longueur d'onde d'excitation dans le contexte de notre travail, comme les signatures spectrales sont dominées par celle du cytochrome *c* à 514 et 530 nm. Nos travaux suggèrent en particulier que l'attribution de cette signature aux EPS est erronée. Ils vont par ailleurs dans le même sens que les dernières études de Patzold *et al.* [163]

### **3. Signature spectrale Raman des bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *E. coli* en fonction de leur phase de croissance**

L'objectif de ce paragraphe est d'étudier si on peut corréler des variations spectrales à l'évolution du métabolisme bactérien en fonction des phases de croissance bactérienne.

#### **3.1. Courbes de croissance**

Les bactéries introduites dans un nouvel environnement passent par une succession de phases de croissance qui se distinguent par des profils métaboliques différents. La Figure III.11 montre les courbes de croissance de deux modèles bactériens de cette étude, *P. fluorescens* et *E. coli* dans du bouillon LB 25 g/L selon les conditions décrites dans le chapitre II.

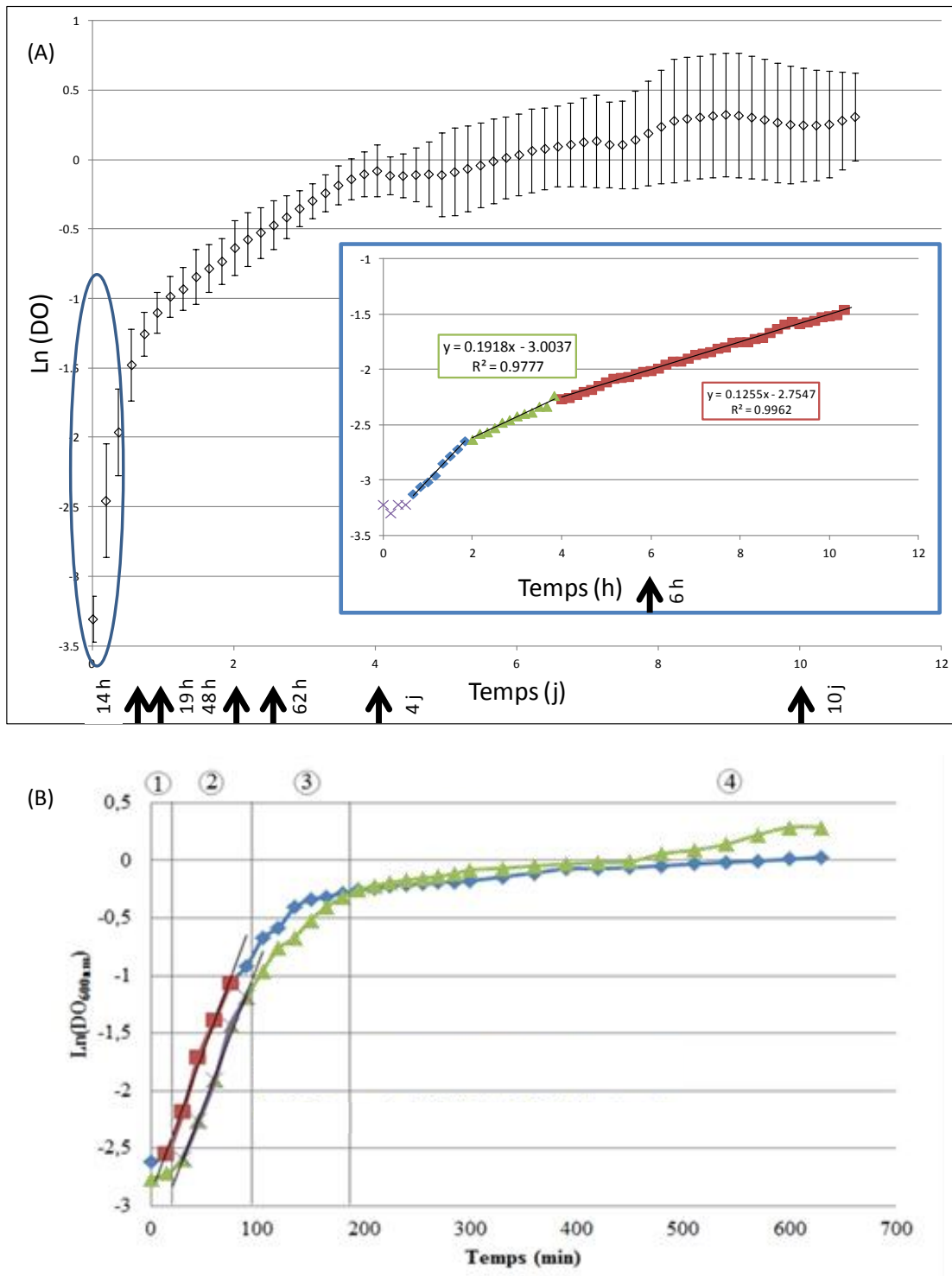


Figure III.11 : (A) Courbe de croissance de *P. fluorescens*, un agrandissement de la cinétique entre 0 et 12 h est présenté en insertion, (B) deux exemples de courbes de croissance d'*E. coli* dans du LB 25 g/L, (1). phase de latence, (2). phase exponentielle de croissance, (3). Fin de la phase exponentielle, (4). phase stationnaire

Une courbe de croissance bactérienne se décompose normalement en quatre phases [270] : (i) une phase de latence caractérisée par une croissance nulle. Durant cette phase, les bactéries synthétisent les enzymes nécessaires pour métaboliser les nutriments disponibles dans le milieu, ainsi que tous les composants biologiques indispensables à la multiplication bactérienne. (ii) Une phase de croissance exponentielle qui commence avec une phase d'accélération durant laquelle le taux de croissance ( $\mu$ ) augmente progressivement. Un taux de croissance maximale est atteint à la phase logarithmique. Il est caractéristique de la souche bactérienne et des conditions de croissance [255]. Il correspond à la pente de la courbe de croissance durant la phase logarithmique. Pour *P. fluorescens*, nous avons déterminé un taux de croissance de 0,19 générations/heure durant cette phase, ce qui est inférieure à ce qui est normalement reporté pour la souche utilisée [33]. Cette différence peut être attribuée à l'état physiologique du stock bactérien utilisé. Pour *E. coli*, il est de l'ordre de 2,14 générations/heure. Les courbes de croissance d'*E. coli* présentées en Figure III.11 (B) sont en accord avec celles obtenues par Sezonov *et al.* pour la même souche bactérienne *E. coli* K-12 MG 1655. Les auteurs ont cependant calculé un temps de génération de 20 min, donc légèrement inférieur à ce que nous avons mesuré [271]. La phase exponentielle de croissance termine avec une décélération progressive de croissance. (iii) La phase stationnaire est atteinte avec la stabilisation du nombre total de microorganismes. Ceci est le résultat de l'épuisement progressif des nutriments disponibles et de l'accumulation de sous-produits du métabolisme bactérien. Durant cette phase, la population bactérienne reste constante en masse, soit à cause de la diminution de l'activité métabolique et l'établissement d'un équilibre entre le taux de croissance et de la mort cellulaire, soit suite à l'arrêt de croissance et le maintien de l'activité métabolique. (iv) Durant la phase de déclin (non présentée dans la Figure III.11) les bactéries se lysent sous l'action des métabolites secondaires et du changement du pH. Cette phase débute à partir de 20j [33] pour *P. fluorescens* et vers 20h pour *E. coli*.

### **3.2. Spectres Raman à différents stades de croissance de *Pseudomonas fluorescens***

La Figure III.12 montre les spectres de culots bactériens de *P. fluorescens* recueillis aux différents temps de croissance indiqués par des flèches sur la Figure III.11 à savoir : 6h, moitié de la phase exponentielle ; 14h, fin de la phase exponentielle ; 19h, début de la phase stationnaire ; 48h, 62h, 4j, 10j, moitié de la phase stationnaire ; 26j et 35j, phase de déclin.



Nous indiquons toutefois que pour la phase de déclin, la biomasse récupérée était plus faible que pour les autres phases de croissance, d'où un rapport signal / bruit faible des spectres

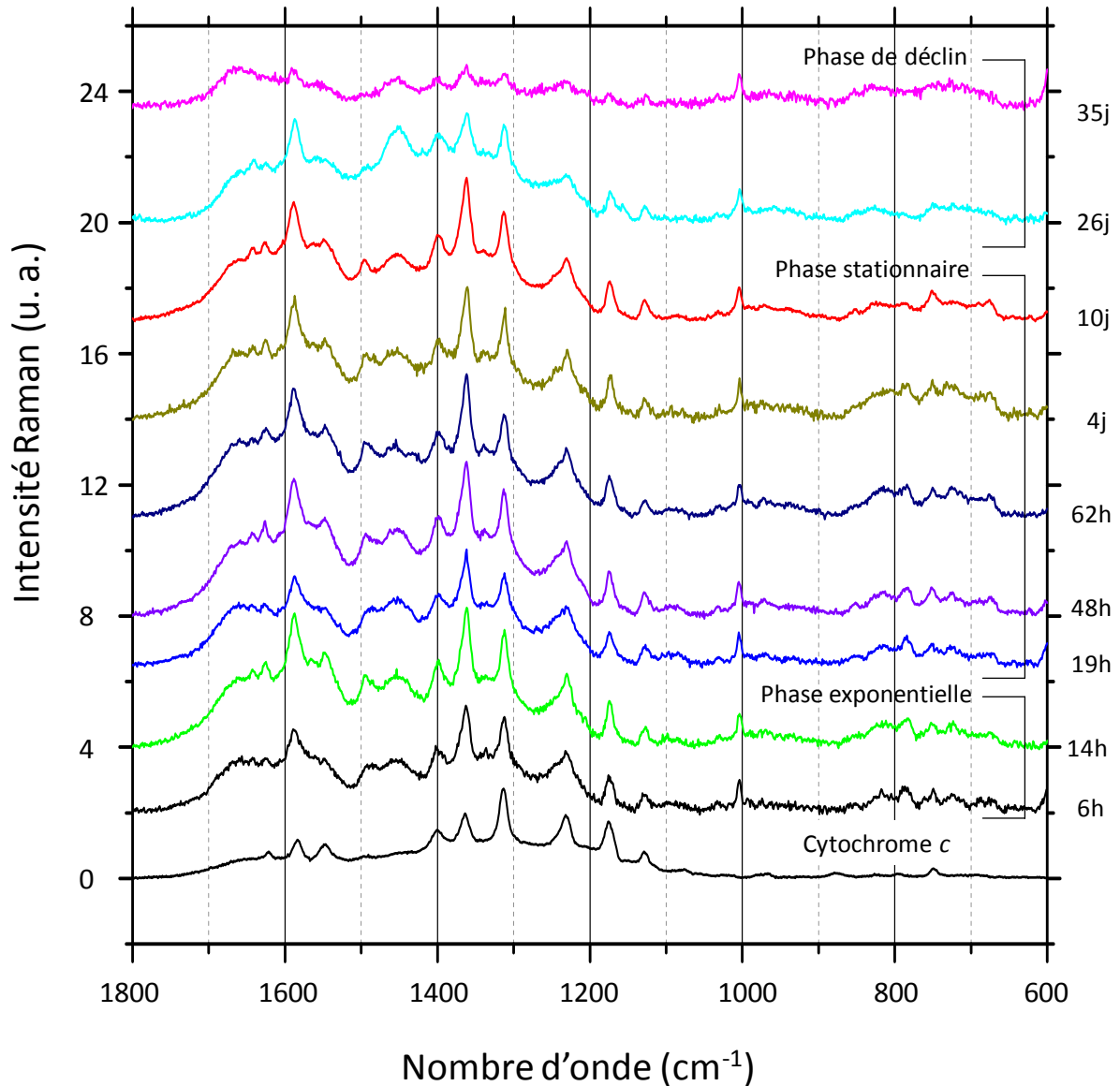


Figure III.12 : Spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de *P. fluorescens* recueillies à différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 14 (fin de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), 48 h, 62h, 4j et 10j (moitié de la phase stationnaire), 26 et 35 j (phase de déclin), et du cytochrome *c*. Les spectres des culots bactériens sont normés par rapport à la bande à  $1003\text{ cm}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm, réseau à 1200 traits.

Quelle que soit la phase de croissance on constate que la signature du cytochrome est présente. Son intensité variant d'un endroit à l'autre d'un même échantillon et d'un échantillon à l'autre, elle ne semblerait pas être corrélée à la phase de croissance. Mais

l'intensité de cette signature était nettement atténuée à 35 j, d'où elle pourrait éventuellement être reliée à l'état physiologique des bactéries. Comme sa signature chevauche celles des autres composants biologiques, celle-ci est susceptible de masquer de petites variations qui pourraient avoir lieu autour des pics intenses du cytochrome *c* à 514 nm à savoir vers : 750, 1128, 1174, 1230, 1313, 1362, 1400, 1544 et 1585  $\text{cm}^{-1}$ . La région en dessous de 1000  $\text{cm}^{-1}$  est moins susceptible d'être perturbée par la signature du cytochrome *c* comme le montre les Figure III.3 et Figure III.4. Un agrandissement de cette région est présenté dans la Figure III.13.

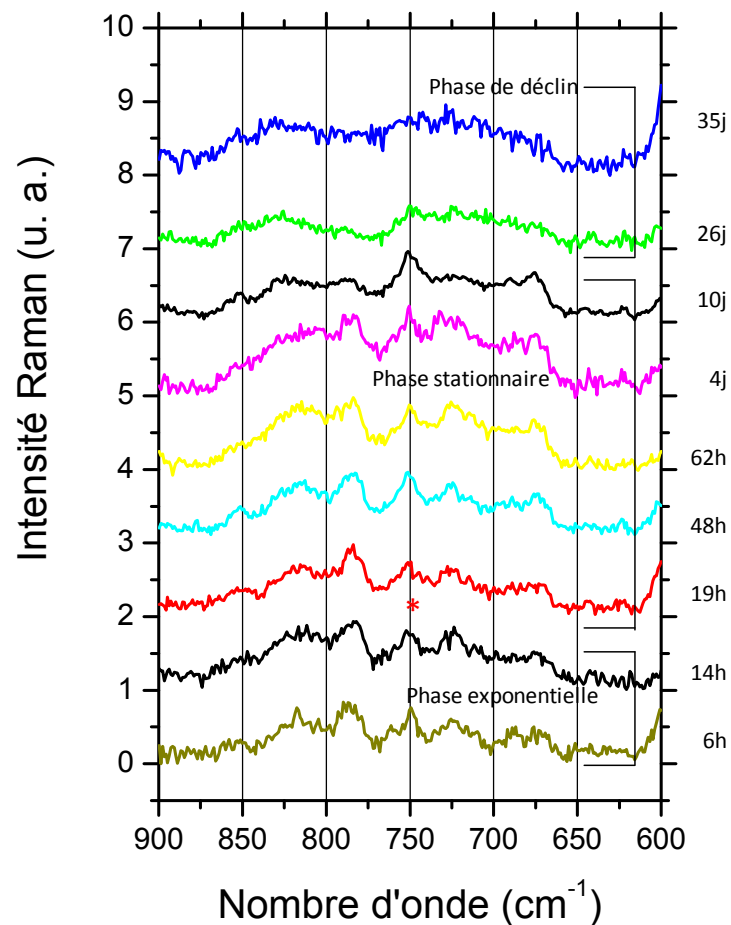


Figure III.13 : Agrandissement de la région entre 900 et 600  $\text{cm}^{-1}$  des spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de *P. fluorescens* recueillies à différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 14 (fin de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), 48 h, 62h, 4 j et 10j (moitié de la phase stationnaire), 26 et 35 j (phase de déclin). Les spectres sont normés par rapport à la bande à 1003  $\text{cm}^{-1}$ , \* : bande du cytochrome *c*,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm, réseau à 1200 traits.

Il aurait fallu effectuer cette étude plutôt en utilisant une longueur d'onde de 488nm mais celle-ci a été réalisée avant l'élucidation de la signature complète de *P. fluorescens*. L'analyse pour 3 temps de culture à savoir 6h, 19h et 26j a toutefois été refaite plus tard au cours de la

thèse en utilisant la longueur d'onde d'excitation de 488nm (Figure III.14). Pour la souche *E. coli* UGB 2152, l'analyse a été faite pour deux temps de culture à savoir 1h et 8h correspondant respectivement à la moitié de la phase exponentielle et de la phase stationnaire. Les spectres correspondants sont présentés en Figure III.14.

Nous avons observé dans les spectres individuels des légères variations au niveau des intensités relatives des bandes pour la même phase de croissance voire le même échantillon (non présenté), ceci pourrait venir de l'hétérogénéité cellulaire. En effet, à une phase de croissance, les bactéries ne sont pas toutes au même stade du cycle cellulaire et donc n'ont pas la même composition chimique d'où l'hétérogénéité de la signature spectrale.

Concernant l'évolution des acides nucléiques, on observe sur les spectres individuels de *P. fluorescens*, que les pics à  $720\text{ cm}^{-1}$  (A),  $785\text{ cm}^{-1}$  (C, U),  $810\text{-}830\text{ cm}^{-1}$  (O-P-O) voire vers  $670\text{ cm}^{-1}$  (T, G) augmentent progressivement jusqu'à 48h et diminuent ensuite pour finir dans le bruit au bout de 26 j. On observe des variations assez semblables pour le massif à  $1485\text{ cm}^{-1}$  (A, G), de même pour un petit pic à  $1335\text{ cm}^{-1}$  attribué partiellement à l'adénine. A 488 nm, on observe une évolution similaire du pic à  $1575\text{ cm}^{-1}$  et de la bande vers  $1240\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux protéines et aux acides nucléiques, or comme les spectres sont normés par rapport à la phénylalanine, sa variation reflète principalement celles des acides nucléiques. De même pour *E. coli*, l'intensité de ces pics est fortement atténuée à 8h de croissance (Figure III.14.B).

Ces résultats sont en accord avec les observations d'Escoriza *et al.* [272] sur les spectres d'*E.coli* et de *Staphylococcus epidermidis* présentant une intensité maximale des bandes associées aux acides nucléiques durant la phase exponentielle de croissance. Ainsi qu'avec les travaux de Huang *et al.* qui ont reporté un rapport des acides nucléiques aux protéines dans la phase exponentielle supérieur à celui dans la phase stationnaire [158].

Ces différentes observations peuvent être associées avec la diminution de la production des acides nucléiques par rapport aux protéines au cours de la phase stationnaire. D'autre part, le massif vers  $785\text{ cm}^{-1}$  est partiellement attribué à la vibration de la liaison O-P-O de l'ADN, donc sa diminution traduit non seulement la diminution des bases C et U mais aussi une dissociation des liaisons phosphodiester de l'ADN [273]. Ceci est confirmé aussi par la disparition progressive de la bande  $813\text{ cm}^{-1}$  attribuée à la vibration de la liaison O-P-O de l'ARN.

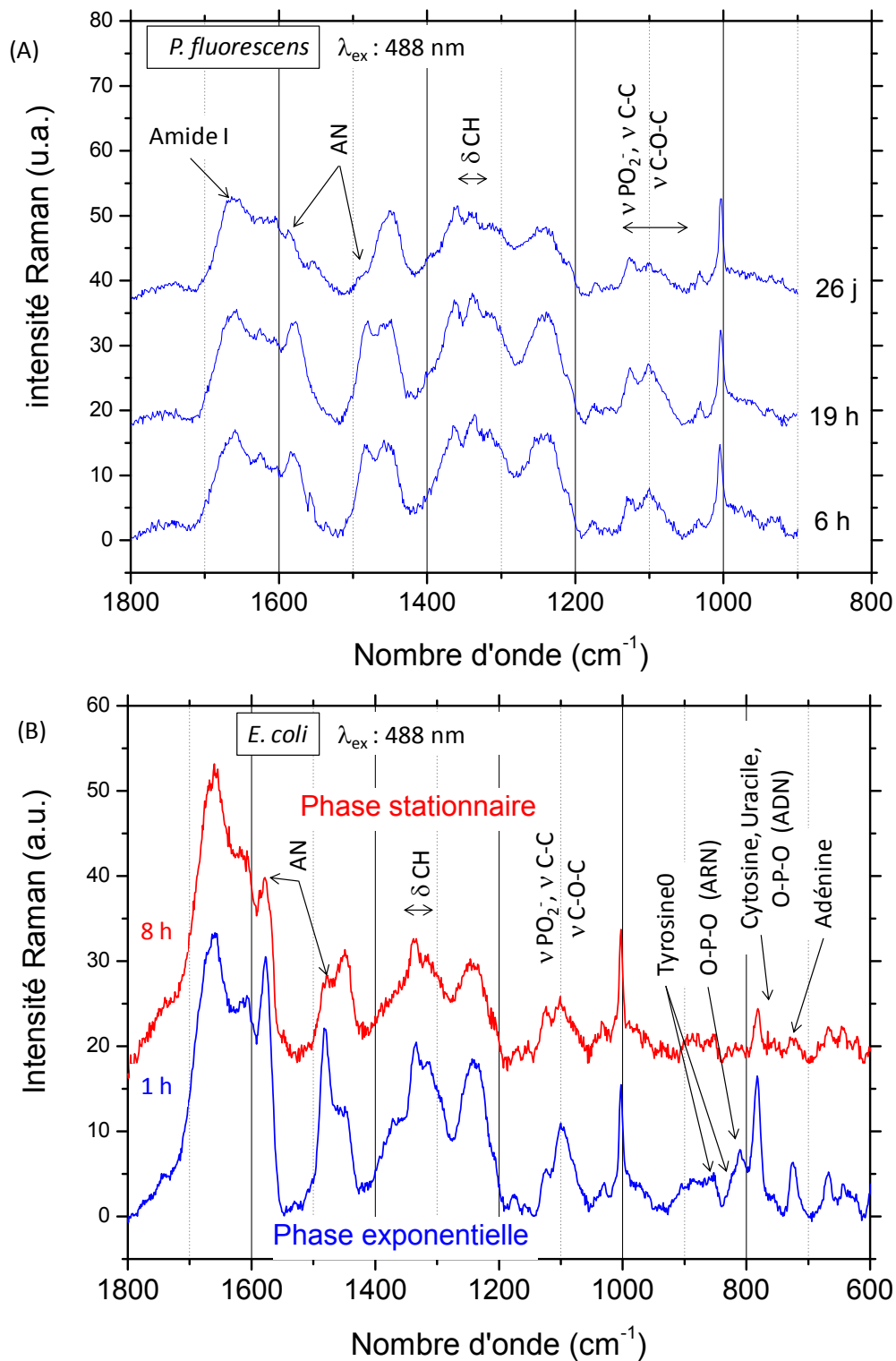


Figure III.14 : Spectres Raman de culots bactériens partiellement hydratés de cultures (A) de *P. fluorescens* recueillies aux différents temps de cultures : 6h (début de phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), et 26 j (phase de déclin), et (B) d'*E. coli* recueillies à 1h : phase exponentielle et à 8h : phase stationnaire,  $\lambda_{ex} : 488 \text{ nm}$ , réseau à 1200 traits.

Concernant l'évolution des carbohydrates et des lipides par rapport à celle des protéines, l'analyse est beaucoup plus délicate car les régions susceptibles de nous donner des informations sont affectées à 514nm par la signature du cytochrome.

La région des vibrations CH est susceptible de donner des informations, la Figure III.15 montre une comparaison de cette région pour des cultures de *P. fluorescens* de 6h, 19h et 26J.

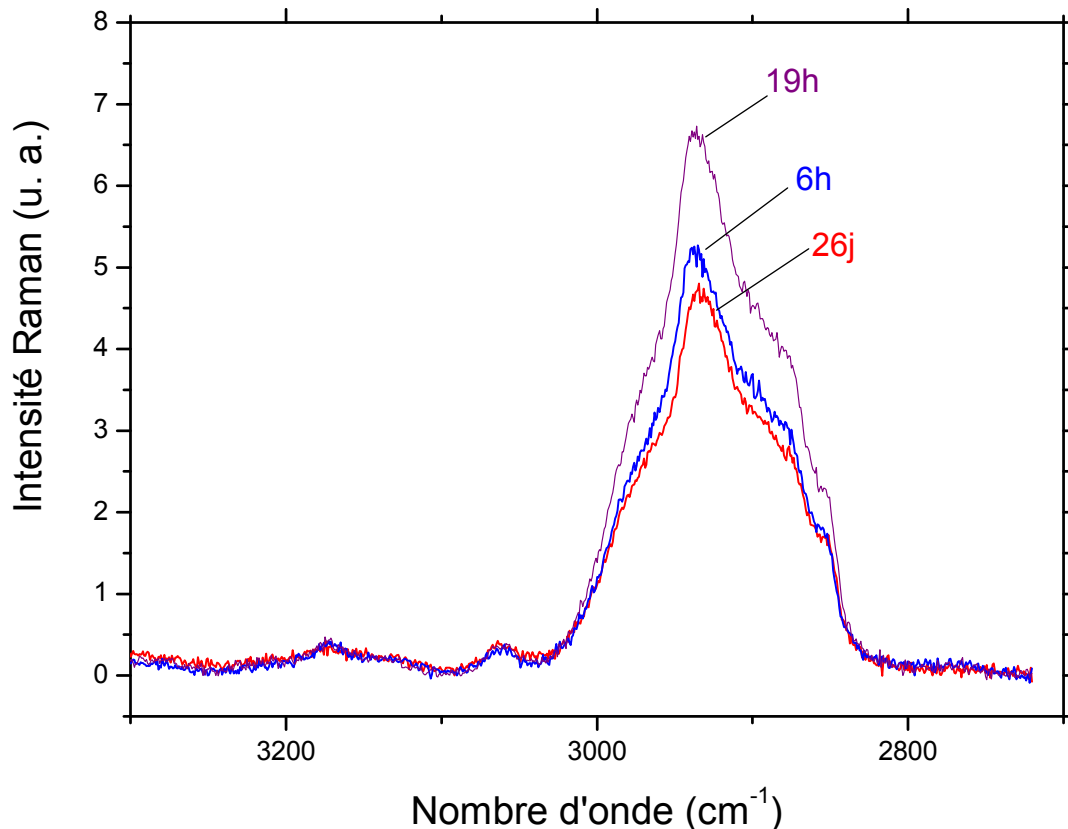


Figure III.15 : Comparaison de la région des vibrations CH dans les spectres de culots bactériens partiellement hydratés de cultures de *P. fluorescens* recueillies aux différents temps de cultures : 6h (début de la phase exponentielle), 19 h (début de la phase stationnaire), et 26 j (phase de déclin). Les spectres sont normés par rapport à la bande à 1003 cm<sup>-1</sup> de la phénylalanine.  $\lambda_{ex}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits.

Ces spectres montrent une nette augmentation de l'intensité de 6h à 19h, ce qui traduit une production plus importante de polysaccharides et de lipides par rapport aux protéines, puis une chute à 26J avec un décalage de 3 cm<sup>-1</sup> vers les nombres d'onde inférieurs. Ceci est confirmé par l'évolution de la bande vers 1445 cm<sup>-1</sup> attribuée à la vibration de déformation

CH<sub>2</sub>, qu'on voit sur les spectres à 488 nm. Celle-ci augmente légèrement en intensité à 19h et diminue à 26j.

De même, la région située entre 1150 et 1060 cm<sup>-1</sup> peut fournir des informations. Elle contient deux bandes principales à 1128 et 1100 avec un épaulement à 1085 cm<sup>-1</sup>. Les biomolécules contributrices à ces bandes sont:

- A 1128 cm<sup>-1</sup> : carbohydrates (νC-O), lipides ((νC-C)
- 1100 : acides nucléiques (νPO<sub>2</sub><sup>-</sup>), Phospholipides (νPO<sub>2</sub><sup>-</sup>), carbohydrates (νCC et COC)
- 1085 : carbohydrates (νC-O, νC-O-C, δC-O-H)

Ceci étant compte tenu des signatures Raman de chacune de ces biomolécules [245] et de la forte diminution de ce massif lors de la phase de déclin on peut considérer que les principaux contributeurs de ces 3 bandes sont les acides nucléiques à 1100 cm<sup>-1</sup>, les carbohydrates à 1085 cm<sup>-1</sup> et les carbohydrates et à un moindre degré les lipides à 1128 cm<sup>-1</sup>.

Pour *P. fluorescens*, on observe à 488nm que l'intensité de l'ensemble de cette région augmente de 6 à 19h puis diminue à 26j reflétant une production de plus en plus importante au cours de la phase exponentielle des carbohydrates, des lipides et des acides nucléiques par rapport aux protéines. A 488nm on observe parfaitement que le massif vers 1100 cm<sup>-1</sup> augmente de 6 à 19h puis diminue à 26J. Cependant le rapport des intensités I<sub>1128</sub>/I<sub>1092</sub> augmente progressivement de 6h à 26j, et l'épaulement à 1085 cm<sup>-1</sup> s'atténue à 19h reflétant une diminution de la production des polysaccharides et des acides nucléiques par rapport aux lipides. De même pour *E. coli*, on observe une diminution de l'intensité de l'ensemble de cette région avec une forte augmentation du rapport I<sub>1128</sub>/I<sub>1092</sub> à 8h de croissance.

Nous avons pu observer sur les spectres Raman de *P. fluorescens* et d'*E. coli* des variations spectrales qui reflètent l'évolution du métabolisme bactérien en fonction de la phase de croissance. Les bandes les plus informatives étant notamment celles correspondants aux acides nucléiques.



**Chapitre IV**  
**Caractérisation *in situ* de jeunes**  
**biofilms de *Pseudomonas***  
***fluorescens* et d'*Escherichia coli***  
**sous conditions de croissance non**  
**stressantes**





Ce chapitre est consacré à la caractérisation *in situ* par spectroscopies vibrationnelles de la composition chimique de biofilms de 24h de *P. fluorescens* et d'*E. coli* formés dans des conditions de croissance non stressantes et à l'analyse par AFM de la conformation des exopolymères au sein de ceux-ci. Il constituera ainsi une référence pour l'étude dans un second temps de la formation de ces biofilms sous condition de stress acide.

## *1. Biofilm de 24h de Pseudomonas fluorescens à pH 7*

---

### **1.1. Suivi *in situ* des premières étapes de formation d'un biofilm de *P. fluorescens* par spectroscopie infrarouge en mode réflexion totale atténuée (IR-ATR)**

L'évolution de l'empreinte spectrale IR-ATR des biofilms de *P. fluorescens* lors des 24 premières heures de leur formation a été étudiée dans des travaux précédents de notre équipe. L'intérêt de cette partie de travail est donc de s'assurer de la qualité du biofilm naissant, pour pouvoir réaliser ensuite des analyses par MRC et AFM.

#### **1.1.1. Signature IR d'un culot bactérien de *P. fluorescens* planctoniques**

La Figure IV.1 présente un spectre IR enregistré en mode ATR d'un culot de *P. fluorescens* recueillies en fin de la phase exponentielle de croissance. Les attributions des bandes principales indiquées sur le spectre de la Figure IV.1 sont en accord avec la littérature [117, 147, 245, 274-276].

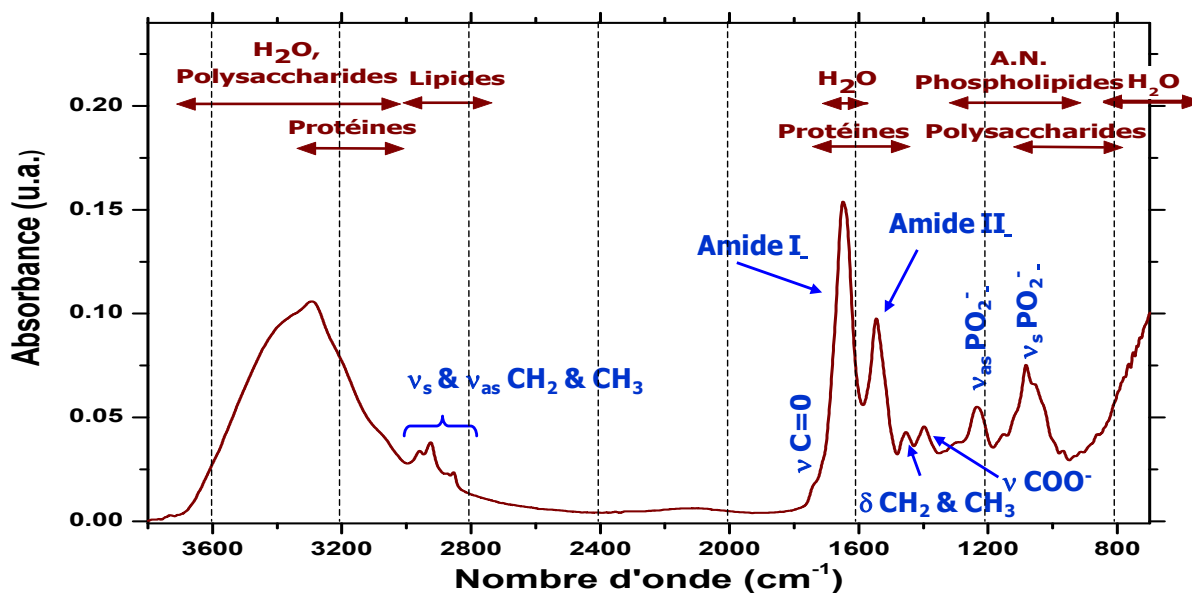


Figure IV.1 : Spectre IR-ATR typique d'un culot partiellement hydraté de bactéries *P. fluorescens* planctoniques collectées en fin de phase exponentielle. Cristal ATR en germanium (A.N : acides nucléiques)

Les attributions des différentes bandes sont résumées dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Attributions principales des bandes d'absorption IR-ATR dans un spectre de culot bactérien de *P. fluorescens* recueillies en phase exponentielle. Cristal ATR en germanium  $\nu_s$  : élongation symétrique,  $\nu_{as}$  : élongation antisymétrique,  $\delta$  : déformation

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attributions principales	
~3400	$\nu$ O-H <sup>[245, 277]</sup>	Eau, protéines, polysaccharides
3288	$\nu$ N-H	Amide A des protéines <sup>[245]</sup>
2962	$\nu_{as}$ C-H <sub>3</sub>	Acides gras <sup>[245, 277]</sup>
2925	$\nu_{as}$ C-H <sub>2</sub>	Acides gras <sup>[245, 277]</sup>
2875	$\nu_s$ C-H <sub>3</sub>	Acides gras <sup>[245, 277]</sup>
2854	$\nu_s$ C-H <sub>2</sub>	Acides gras <sup>[245, 277]</sup>
1744	$\nu >C=O$ <sup>[277, 278]</sup>	Esters des lipides <sup>[117]</sup>
1649	Amide I : 80 % $\nu$ C=O, 10% $\nu$ C-N, 10% $\delta$ N-H <sup>[117, 245, 277, 279, 280]</sup>	Protéines <sup>[245]</sup>
~1640	$\delta$ H <sub>2</sub> O	
1547	Amide II : 60% $\delta$ N-H, 40% $\nu$ C-N <sup>[117, 245, 277, 279, 280]</sup>	Protéines <sup>[245]</sup>

1455	$\delta$ CH <sub>2</sub> [245, 277]	Lipides [117]
1399	$\nu_s$ C=O des CO <sub>2</sub> [245, 277]	Protéines, lipides
~1300	Amide III : 30% $\nu$ C-N, 30% $\delta$ N-H, 10% $\nu$ C=O, 10% $\delta$ O=C-N [117, 245, 279]	Protéines [245]
1240-1220	$\nu_{as}$ P=O des >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [245, 277]	Phosphodiesteres [245], acides nucléiques, phospholipides, lipopolysaccharides [117]
1153	$\nu_s$ C-O-H, $\nu$ C-O [117]	Polysaccharides [117, 245], protéines [117]
1085-1082	$\nu_s$ P=O des >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [245]	Phosphodiesteres, phospholipides, acides nucléiques, polysaccharides [117]
1054	$\nu_s$ C-O-C, $\nu_s$ P-O-C (R-O-P-O-R') [117]	Polysaccharides

### 1.1.2. Suivi *in situ* des 24 premières heures de la formation d'un biofilm de *P. fluorescens*

La première étape de formation des biofilms de *P. fluorescens* est l'adhésion des bactéries à la surface du cristal ATR de Ge assurée par la circulation d'une suspension bactérienne S<sub>0-Pf</sub> (**cf. chap. II-2.2.2**) pendant trois heures. La Figure IV.2 montre un exemple de l'évolution des spectres IR-ATR en fonction du temps. Les résultats présentés sont représentatifs des études menées au cours de ce travail.

Les spectres montrent les différentes bandes IR trouvées dans un spectre de culot bactérien et ceci dès le premier spectre enregistré soit après dix minutes de circulation de la suspension S<sub>0-Pf</sub>. A part les bandes attribuées aux vibrations de l'eau, l'intensité de toutes les bandes IR augmente en fonction du temps ce qui reflète la colonisation bactérienne de la surface. La diminution de l'intensité des bandes associées aux vibrations de l'eau est attribuée au remplacement des molécules d'eau à la surface du cristal par de la biomasse.

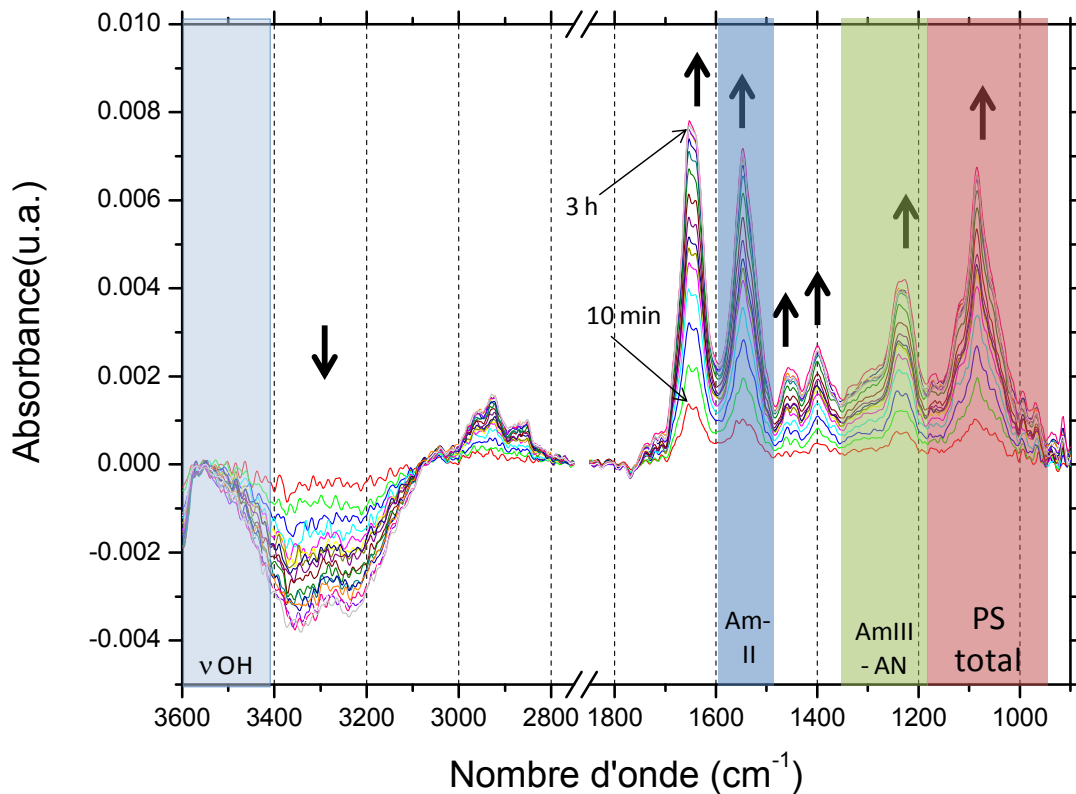


Figure IV.2 : Evolution du profil spectral IR-ATR au cours de la circulation de  $S_{0-Pf}$ . Cristal ATR en germanium. Bornes d'intégration de bandes IR d'intérêt :  $\nu$ OH 3600-3400  $\text{cm}^{-1}$  (zone bleu claire), AmII (amide II) 1600-1480  $\text{cm}^{-1}$  (zone bleu foncée), AmIII-AN (amide III et acides nucléiques) 1340-1180  $\text{cm}^{-1}$  (zone verte), PS (polysaccharides) total 1195-950  $\text{cm}^{-1}$  (zone rouge)

Les principales bandes IR sont indiquées sur la Figure IV.2 : i) la région entre 3600 et 3400  $\text{cm}^{-1}$  est associée avec la vibration d'élongation du groupement O-H et sera notée  $\nu$ OH. ii) La région entre 1800 et 950  $\text{cm}^{-1}$  permet de suivre l'ensemble des biomolécules présentes à la surface du cristal. iii) La bande amide II, notée Am II, de 1600 à 1480  $\text{cm}^{-1}$  est principalement associée aux vibrations des protéines. iv) La région de 1340 à 1180  $\text{cm}^{-1}$  est associée à l'élongation antisymétrique du groupement phosphate des acides nucléiques et des phospholipides et partiellement à l'amide III des protéines, cette région sera nommée AmIII – AN. v) La région entre 1195 et 950  $\text{cm}^{-1}$  est associée aux vibrations d'élongation et de déformation des polysaccharides et à la vibration d'élongation symétrique du groupement phosphate des acides nucléiques et des phospholipides, cette bande sera notée PS total dans la suite de ce manuscrit. L'évolution des aires intégrées de ces bandes IR au cours des trois heures de la circulation de  $S_{0-Pf}$  est présentée dans la Figure IV.3.

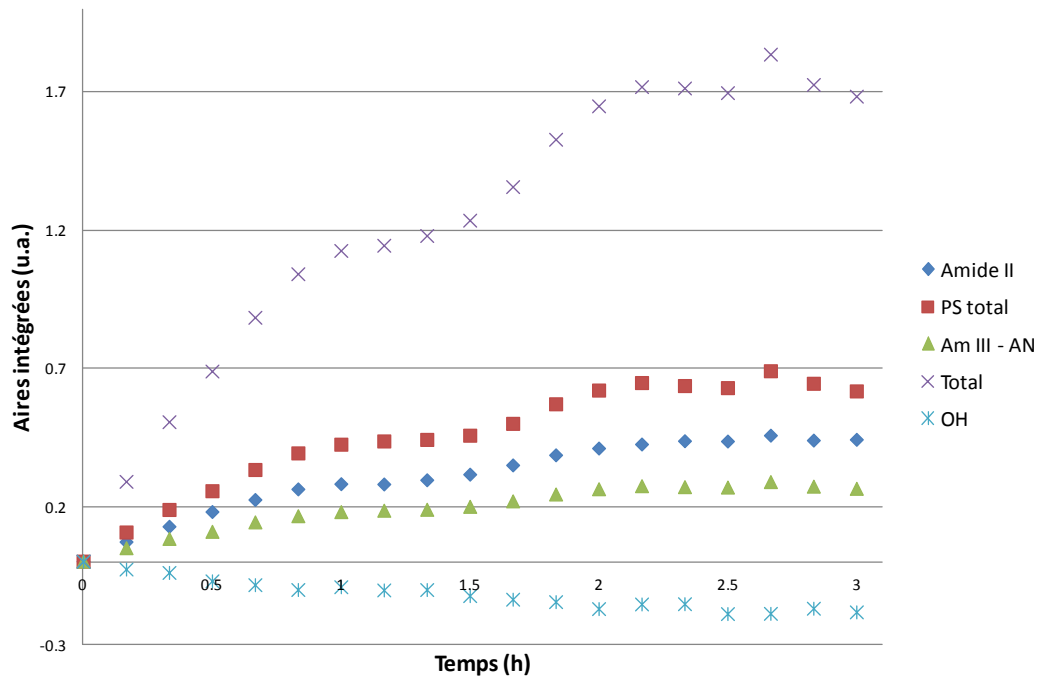


Figure IV.3 : Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR acquis au cours de la circulation de  $S_{0-Pf}$ . Cristal ATR en germanium. Amide II  $1600-1480\text{ cm}^{-1}$ , PS (polysaccharides) total  $1195-950\text{ cm}^{-1}$ , AmIII-AN (Amide III - acides nucléiques)  $1340-1180\text{ cm}^{-1}$ , total  $1800-950\text{ cm}^{-1}$ , OH  $3600-3400\text{ cm}^{-1}$

Les cinétiques que nous avons observées sont conformes à celles obtenues dans des travaux précédentes de notre équipe sur des biofilms de *P. fluorescens* [33, 117, 118]. On remarque d'ailleurs la présence des plateaux plus ou moins marqués en fonction des expériences. Il a été démontré que ces cinétiques peuvent varier légèrement en fonction de plusieurs paramètres tels que les conditions de culture, la phase de croissance à laquelle les bactéries ont été récupérées pour la préparation de  $S_0$  et la concentration en bactéries de cette suspension [149, 154, 281]. Comme l'ont montré des travaux antérieurs, ces cinétiques quelque peu différentes ne modifient pas significativement la qualité et les caractéristiques du biofilm qui se développe après cette première étape d'adhésion bactérienne [118].

A la fin des trois heures de circulation de  $S_{0-Pf}$ , la suspension bactérienne a été remplacée par du milieu nutritif dilué (LB/50) de pH 7 pendant 21 h. La Figure IV.4 montre l'évolution des aires intégrées des principales bandes IR au cours de la circulation du milieu LB/50 et quelques spectres enregistrés à différents temps.

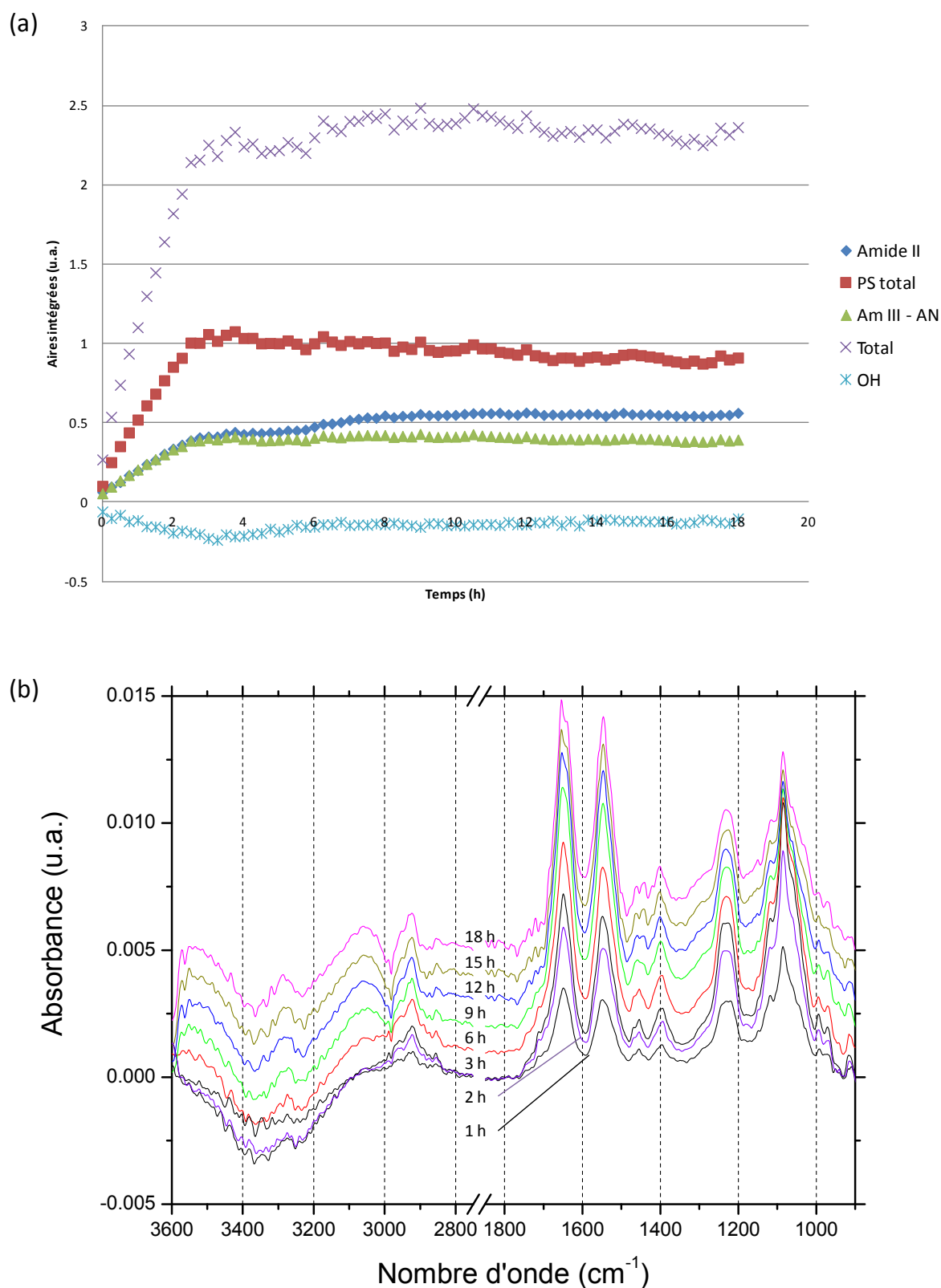


Figure IV.4 : (a) Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR acquis au cours de la circulation du milieu LB/50 (b) Evolution du profil des spectres IR-ATR acquis après 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 et 18h de circulation de LB /50. La référence des spectres est le spectre acquis en début de la circulation de LB/50. Cristal ATR en germanium

Les cinétiques de développement montrent une augmentation des aires intégrées des principales bandes IR pendant les quatre premières heures de circulation de LB, sauf celle des elongations OH qui continue à diminuer, ce qui reflète le développement du biofilm à la surface du cristal. Dans les quatre heures qui suivent, la bande amide II continue à augmenter alors que la bande PS total diminue, les autres bandes atteignent un plateau. L'augmentation de la bande amide II jusqu'à six heures de circulation de LB/50 avec la stabilisation des autres bandes a été reportée par Quilès et *al.* [65]. Au-delà de sept heures de circulation du milieu LB/50, la bande amide II atteint un plateau, la bande PS total diminue légèrement et la bande AmIII-AN diminue à un moindre degré. Quilès et *al.* [65] ont associé la diminution de ces deux bandes à 24h de circulation de LB/50 à une diminution de l'activité métabolique des bactéries. La stabilisation de la bande amide II n'est pas forcément associée avec un arrêt du développement du biofilm, ce dernier pouvant continuer à croître en épaisseur mais au-delà de la zone sondée par l'onde IR évanescente. Alors que le biofilm âgé de 6h est constitué essentiellement d'une monocouche [65], les images par microscopie à épifluorescence du biofilm à 24h (Figure IV.5) montrent en effet une structure en multicouches soulignée par la présence dans plusieurs images d'amas de bactéries avec un taux de recouvrement de 65%.

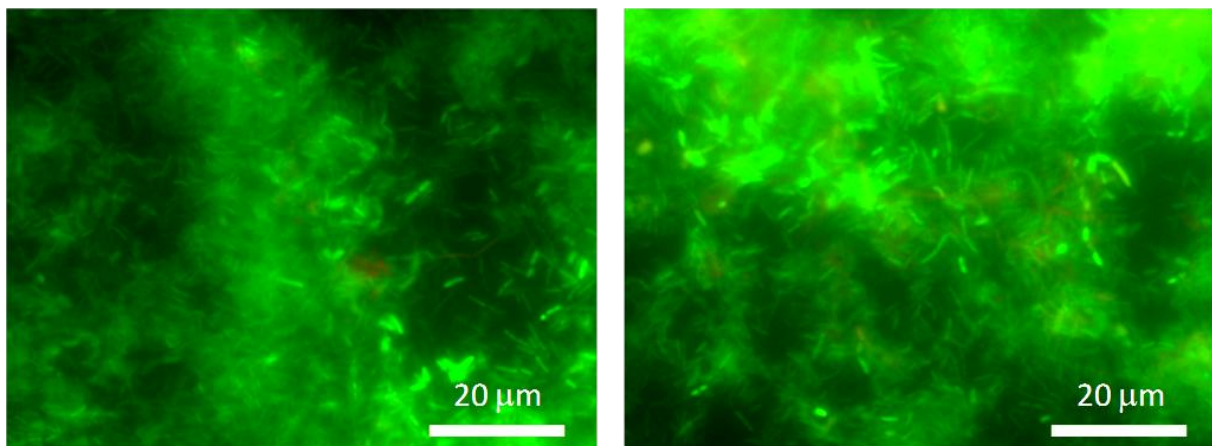


Figure IV.5 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens*, suite au test *Baclight*<sup>TM</sup>. Les deux images correspondent à deux zones différentes du cristal ATR

Les images par microscopie à épifluorescence ont été enregistrées suite au test *BacLight*<sup>TM</sup> (Figure IV.5) qui est un test d'intégrité membranaire permettant de différencier entre les bactéries à membrane intacte et celles à membrane endommagée. Il nous permettra d'étudier ultérieurement l'effet d'un stress acide sur l'intégrité membranaire des bactéries. On remarque



que dans les conditions adoptées, la plupart des bactéries montrent une fluorescence verte suite à ce test (Figure IV.5), et donc possèdent des membranes cellulaires intactes. Ceci confirme que les conditions que nous avons imposées comme de référence sont favorables pour le développement des biofilms.

### 1.1.3. Nature des polysaccharides extra et intra-cellulaires produits

Des travaux précédents de notre équipe ont montré que les bactéries planctoniques *P. fluorescens* produisent du glycogène extracellulaire sous conditions de croissance similaires à celles retenues dans ce travail [65, 141]. La production du glycogène a été révélée grâce à sa signature vibrationnelle et sa localisation au moins en partie extracellulaire a été prouvée par des études de marquage à épifluorescence et par spectroscopie de force [65, 141]. La Figure IV.6 montre les spectres IR d'un culot partiellement hydraté de bactéries de *P. fluorescens* en fin de phase exponentielle cultivées dans des conditions riches en nutriments (LB) (Figure IV.6 a) et d'un biofilm de 21 h de *P. fluorescens* formé sous circulation de LB/50 (Figure IV.6 b).

Le spectre du biofilm montre une augmentation en intensité dans la région de 1300 à 900  $\text{cm}^{-1}$  parallèlement avec un changement du profil de la bande centrée autour de 1085  $\text{cm}^{-1}$  vers les nombres d'onde inférieurs. Les spectres sont normés par rapport à l'amide II des protéines, donc ces variations reflètent essentiellement une production plus importante de polysaccharides, d'acides nucléiques et de phospholipides par rapport aux protéines dans les biofilms de 24h comparativement à l'état planctonique. D'autre part, nous avons utilisé un cristal ATR en germanium dans le cas du biofilm et un accessoire ATR en diamant pour les bactéries planctoniques, la profondeur de pénétration étant trois fois plus importante dans le cas du diamant (Tableau II-4), le spectre de différence ne permet que de donner une idée sur les variations spectrales. Il montre principalement une bande à 1029  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique de polysaccharides. Le changement du profil peut être ainsi relié à une production plus importante de polysaccharides par rapport aux protéines à l'état sessile.

La production du glycogène par *P. fluorescens* a été précédemment démontrée à l'état sessile [65] et planctonique [141] lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu LB dilué (LB/50) mais non dans du LB non dilué. Or, le spectre de différence ne révèle pas ici la signature de

glycogène. L'absence de cette signature peut être associée à une production plus faible de glycogène à celle reportée dans la littérature pour l'état sessile.

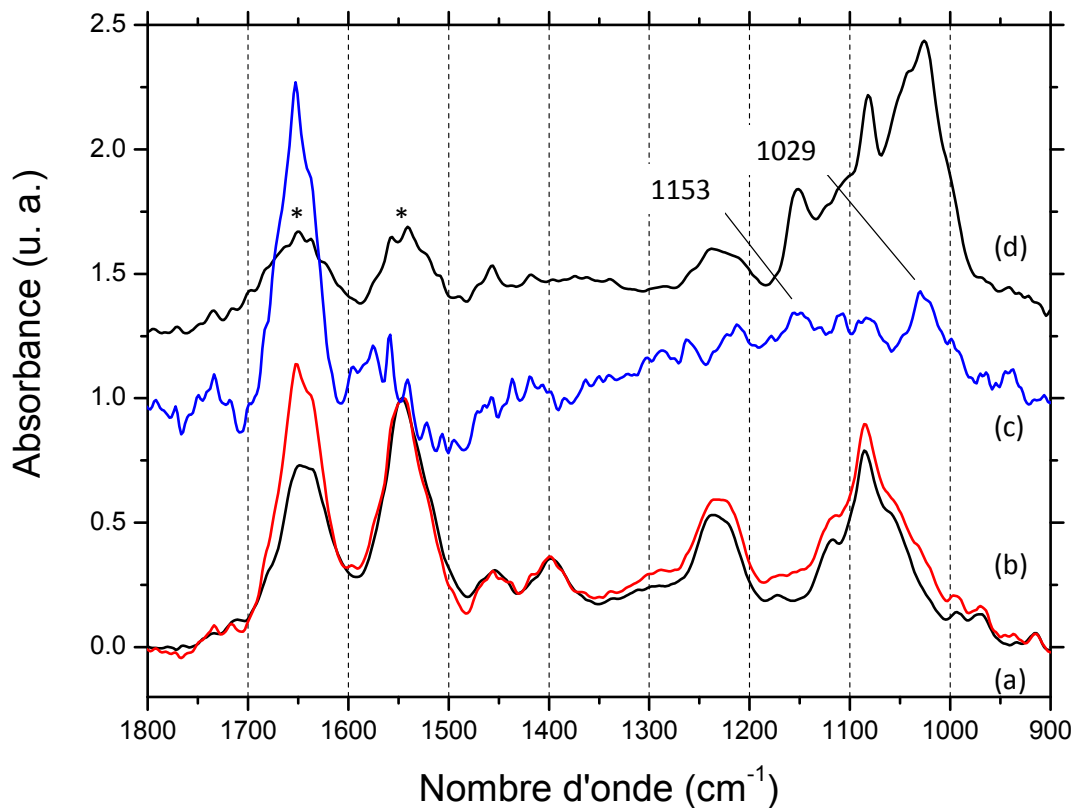


Figure IV.6 : Spectres IR-ATR (a) d'un culot partiellement hydraté de bactéries de *P. fluorescens* planctoniques collectées en fin de phase exponentielle (cristal ATR diamant), et (b) d'un biofilm hydraté de *P. fluorescens* de 21 h (cristal en germanium), (c) la différence (b-a) multipliée par 3 et décalée pour une meilleure lisibilité, (d) du glycogène (solution de 5g/L, accessoire ATR diamant), \* impuretés protéiques dans le glycogène commercial. Les spectres a et b sont normés par rapport à la bande Amide II.

Une des explications possibles est le fait que nous avons utilisé un milieu de culture LB Fluka, alors que dans les travaux publiés, il s'agissait du LB Difco. Selon les fournisseurs, il peut y avoir de faibles variations dans la composition du milieu de culture, et peut avoir des conséquences sur le métabolisme bactérien et par la suite sur la production du glycogène, notamment une production plus faible de ce dernier. Les images par épifluorescence d'un biofilm de 24 h après marquage par la ConA-TxR indiquent la localisation extracellulaire d'un polymère de glucose ou de mannose (Figure IV.7), la ConA-TxR se liant spécifiquement aux résidus de glucose et de mannose sans pouvoir pénétrer les cellules. En se basant sur la littérature [65, 141], nous identifions ce polymère à être le glycogène.

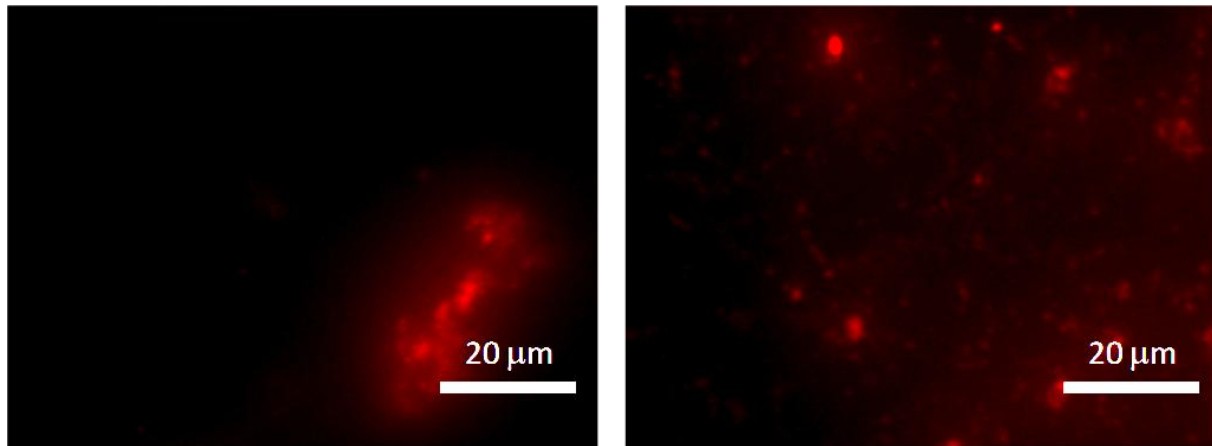


Figure IV.7 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens*, marquage à la ConA-TxR spécifique de résidu de glucose et de mannose

## 1.2. Signature Raman de jeunes biofilms de 24h de *Pseudomonas fluorescens*

La combinaison de la FTIR-ATR et de la MRC permet d'obtenir une empreinte vibrationnelle complète d'un échantillon. Dans ce qui suit, nous évaluons dans un premier temps l'effet de la longueur d'onde d'excitation et de l'état d'hydratation du biofilm sur sa signature Raman. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'étude des variations spectrales accompagnant la transition planctonique-sessile des bactéries.

### 1.2.1. Effet de la longueur d'onde d'excitation sur la signature spectrale Raman des biofilms de *P. fluorescens*

Nous avons montré dans le chapitre III l'importance du choix de la longueur d'onde d'excitation sur le profil spectral des culots bactériens de *P. fluorescens* sous forme planctonique. L'effet Raman de résonance du cytochrome *c* de la chaîne respiratoire domine les spectres Raman de *P. fluorescens* lors d'une excitation avec un laser émettant à une longueur d'onde au voisinage de celle de sa transition électronique (**cf. chapitre III**). Afin de mieux orienter notre choix d'une longueur d'onde d'excitation dans la suite de notre travail, nous avons enregistré les spectres Raman des biofilms de *P. fluorescens* en utilisant les trois longueurs d'onde d'excitation 488, 514 et 530 nm. La Figure IV.8 compare les spectres Raman de biofilms âgés de 24h avec ceux obtenus à l'état planctonique pour les trois longueurs d'onde d'excitation retenues.

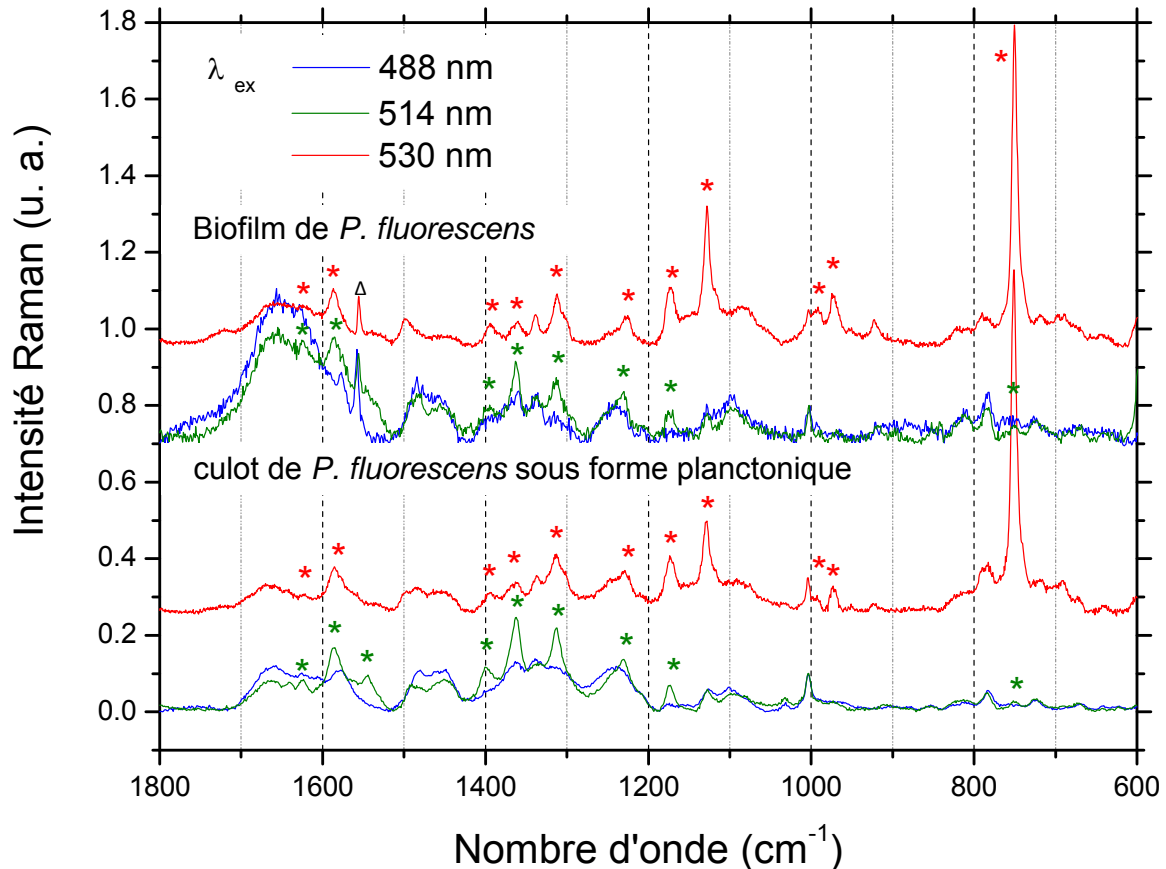


Figure IV.8 : Spectres Raman des biofilms de *P. fluorescens* hydratés de 24 h et des culots bactériens de *P. fluorescens* recueillis en fin de phase exponentielle enregistrés avec différentes longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ). Les spectres sont normés par rapport à la bande à  $1003\text{ cm}^{-1}$  attribuée à la phénylalanine (\* bandes attribuées au moins partiellement au cytochrome *c*,  $\Delta$  bande de vibration de l' $\text{O}_2$ ), réseau à 1200 traits (sauf pour les spectres enregistrés avec une  $\lambda_{ex}$  de 530 nm : réseau à 1800 traits).

Les attributions des bandes d'un spectre Raman de bactéries ont été discutées dans le chapitre III. On retrouve dans les spectres Raman des biofilms la dépendance de la signature Raman en fonction de la longueur d'onde d'excitation observée pour l'état planctonique. L'ensemble des variations trouvées dans les spectres de bactéries planctoniques sont présentes dans les spectres des biofilms.

Malgré les signatures intenses du cytochrome *c*, dans la suite de notre étude, nous avons choisi d'utiliser essentiellement les longueurs d'excitation de 514 et 530 nm, en effet raison d'un meilleur rapport signal/bruit pour ces deux longueurs d'onde. Le recours à la longueur d'onde de 488 nm se fera uniquement lorsque le signal du cytochrome *c* masque des zones spectrales d'intérêt.

### 1.2.2. Effet de l'hydratation sur la signature Raman des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*

L'un des avantages de la MRC est la possibilité de l'utiliser pour l'analyse des échantillons biologiques dans des conditions hydratées. Pour étudier l'effet de l'hydratation sur les spectres Raman des biofilms de *P. fluorescens*, nous les avons enregistrés sous différents états d'hydratation. La Figure IV.9 compare un spectre obtenu dans des conditions hydratées (vert), un spectre enregistré sur un biofilm partiellement hydraté (bleu), ce spectre a été enregistré directement après le retrait du disque du germanium de la cellule de circulation, et un spectre d'un biofilm séché à l'air (rouge). Cette étude a été menée en utilisant un laser émettant à une longueur d'onde d'excitation de 514 nm, à laquelle un effet Raman de résonance du cytochrome *c* se manifeste et domine les spectres des culots de bactéries planctoniques et des biofilms hydratés.

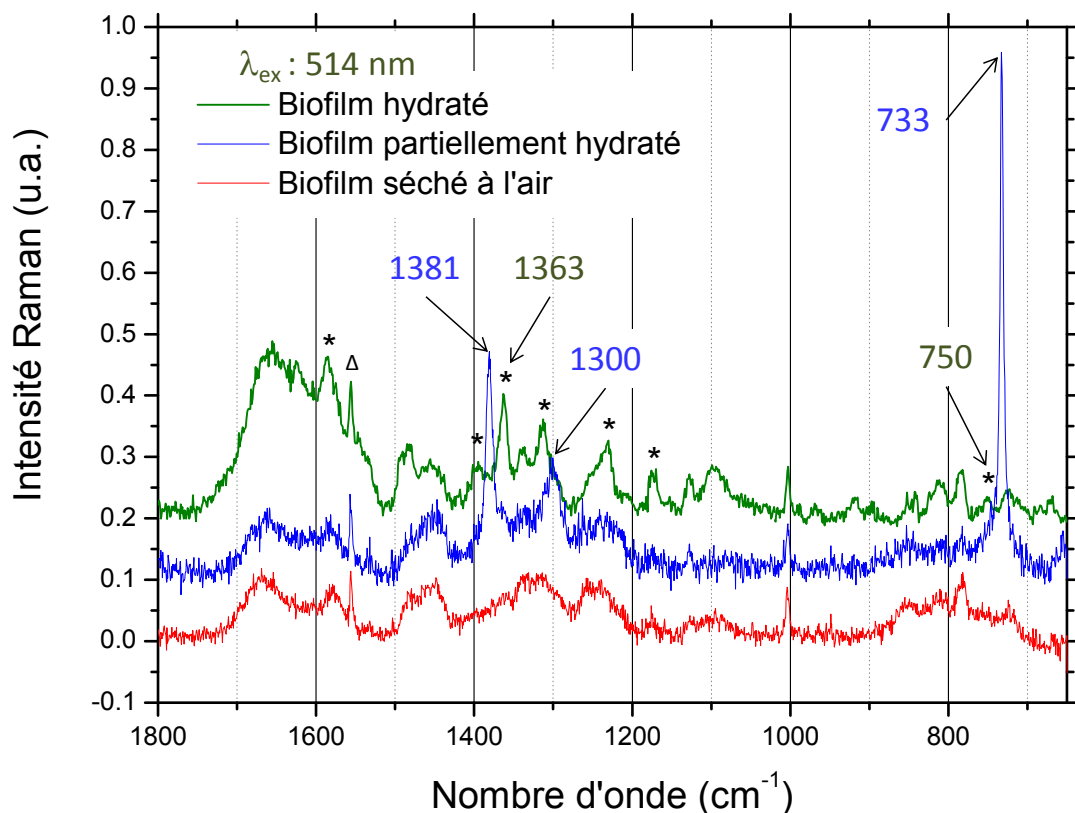


Figure IV.9 : Spectres Raman sous différents états d'hydratation d'un biofilm de *P. fluorescens* de 21 h : hydraté (vert, en haut), partiellement hydraté (bleu, au milieu) et séché à l'air (rouge, en bas), les spectres sont normés par rapport à la bande de la phénylalanine à 1003  $\text{cm}^{-1}$  (\* : bandes attribuées au cytochrome *c*,  $\Delta$  : vibration de l' $\text{O}_2$ ), réseau à 1200 traits,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm

D'après la Figure IV.9, le spectre du biofilm partiellement hydraté présente un profil spectral caractéristique avec l'apparition de deux bandes fines et intenses à 1381 et 733  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci est accompagné par l'augmentation de l'intensité de la bande à 1300  $\text{cm}^{-1}$  ainsi que par la disparition des bandes attribuées au cytochrome *c*. D'autre part, on observe une forte atténuation des bandes attribuées aux acides nucléiques, notamment celles à 1480, 1100, 811 et 720  $\text{cm}^{-1}$ . Dans les spectres des biofilms séchés à l'air, on retrouve une signature spectrale exempte du signal du cytochrome *c*, comparable à celle des bactéries enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Nous avons observé une évolution spectrale similaire dans le cas des cultures planctoniques.

La forme réduite du cytochrome *c* est responsable de l'effet Raman de résonance observé. Son oxydation à l'air peut expliquer la disparition de ces bandes, un état d'oxydation intermédiaire peut être à l'origine de la signature transitoire. Cependant, cette signature n'est pas en accord avec les spectres enregistrés sur du cytochrome *c* à un état d'oxydation intermédiaire [282, 283]. En principe, l'ajout d'un agent réducteur doit restaurer le signal de la forme réduite et sa signature caractéristique. Pour tester cette hypothèse, nous avons ajouté au biofilm séché à l'air, du dithionite de sodium, un agent réducteur. Son effet sur la signature Raman d'un biofilm séché est montré dans la Figure IV.10.

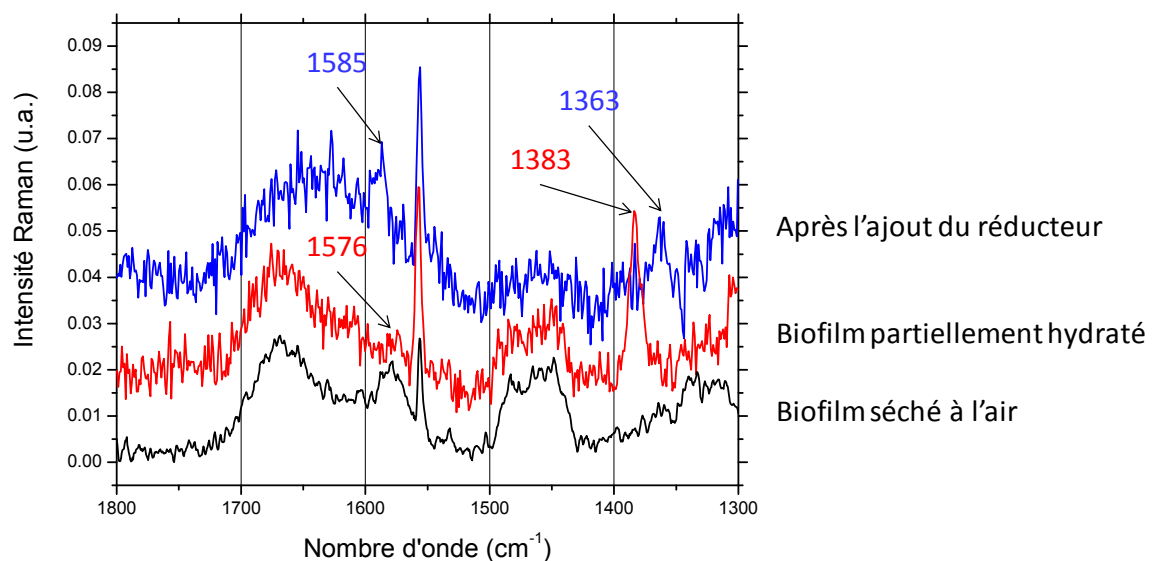


Figure IV.10 : Effet de l'ajout d'un agent réducteur sur la signature Raman d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens* séché à l'air,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm, réseau à 1200 traits

Suite à l'ajout de l'agent réducteur, on remarque l'extinction de la bande à  $1383\text{ cm}^{-1}$  et la réapparition des bandes vers  $1585$  et  $1363\text{ cm}^{-1}$  appartenant au cytochrome *c* réduit. D'après ces observations, on peut conclure que l'ajout de l'agent réducteur permet la réduction du cytochrome *c* et rétablit l'effet Raman de résonance de ce dernier. Il faut toutefois noter que l'agent réducteur a été ajouté sous forme d'une solution aqueuse et par conséquent la réhydratation locale de l'échantillon peut être également à l'origine de ces variations. La présence de l'effet Raman de résonance du cytochrome *c* semble refléter l'état d'oxydation du cytochrome *c*, ou tout au moins sa forme d'oxydation majoritaire ce qui est un bon indicateur de l'état cellulaire [284]. On peut conclure que le profil spectral Raman des biofilms de *P. fluorescens* mais aussi des cultures planctoniques est fortement dépendant de l'état d'hydratation, d'où il est important pour comparer ce qui est comparable de toujours enregistrer les spectres dans un état d'hydratation équivalent.

### 1.2.3. Comparaison des signatures Raman des bactéries planctoniques et sessiles

Afin de pouvoir mieux caractériser l'état bactérien sessile, nous avons comparé les signatures Raman de biofilms à celles de bactéries planctoniques. La Figure IV.11 montre les spectres Raman d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens* (a) et de culots de bactéries de *P. fluorescens* planctoniques en fin de phase exponentielle (b). Ces spectres sont enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm.

Les spectres des biofilms enregistrés avec une excitation à 488 nm ont un faible rapport signal / bruit, cependant ils permettent une étude comparative avec les spectres de bactéries planctoniques car ils sont exempts du signal du cytochrome *c*. Les spectres de bactéries planctoniques et sessiles montrent des différences dans les intensités relatives des différentes bandes. En examinant le spectre de différence, on remarque que ce dernier présente essentiellement des bandes caractéristiques des acides nucléiques, notamment celles à  $1576$ ,  $1483$ ,  $1100$ ,  $810$  et  $783\text{ cm}^{-1}$  ainsi qu'une bande à  $1240\text{ cm}^{-1}$ , (cf. **tableau III.1**). Bien que cette dernière bande soit attribuée majoritairement à la vibration Amide III des protéines, elle renferme aussi des contributions des bases azotées des acides nucléiques [245, 261]. Ceci reflète une production plus importante d'acides nucléiques par rapport aux protéines dans les biofilms comparativement aux bactéries planctoniques et reflètent ainsi une activité métabolique plus élevée.

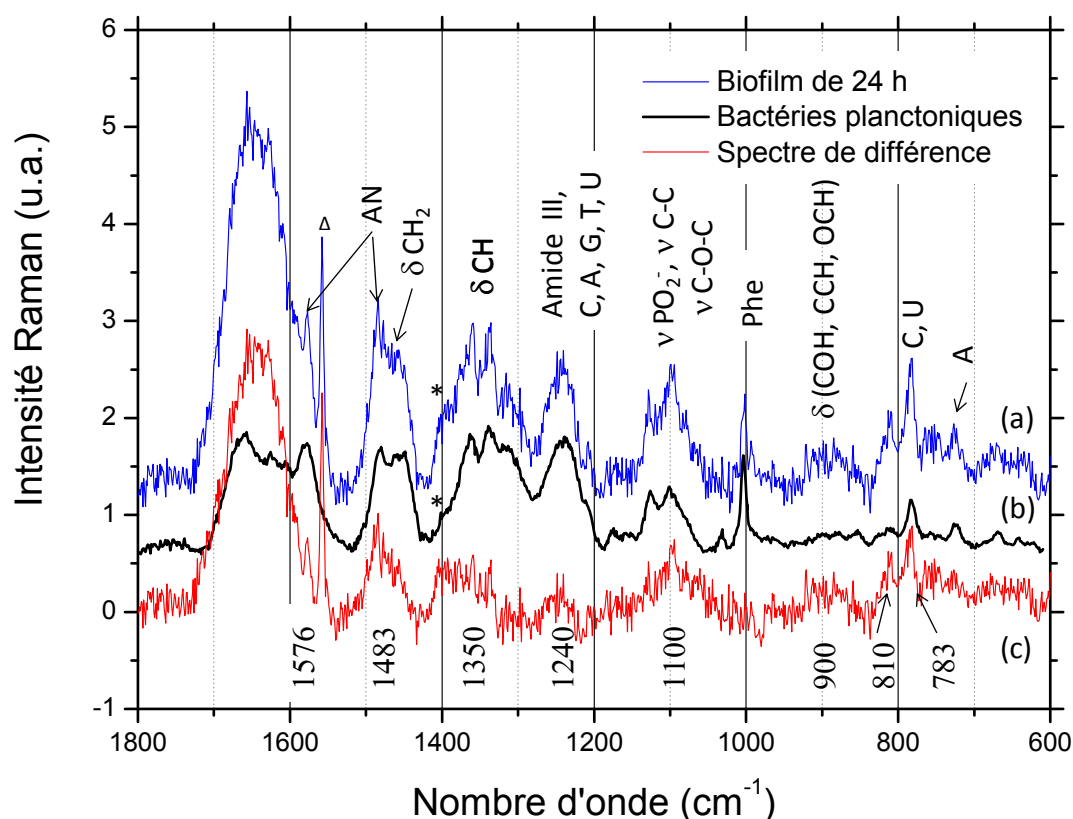


Figure IV.11 : Spectres Raman enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (a) d'un biofilm hydraté de *P. fluorescens*, et (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries de *P. fluorescens* planctoniques collectées en fin de phase exponentielle, les spectres sont normés par rapport à la bande à 1003  $\text{cm}^{-1}$  de phénylalanine. (c) Spectre de différence résultant de la soustraction a – b, réseau à 1200 traits, \* : zone de recollement (C : cytosine, A : adénine, U : uracile, G : guanine, T : thymine, Phe : phénylalanine, Tyr : tyrosine, AN : acides nucléiques,  $\nu$  : vibration d'élongation,  $\delta$  : vibration de déformation)

On trouve également dans le spectre de différence des bandes à 1350 et 900  $\text{cm}^{-1}$ , celles-ci sont attribuées essentiellement aux polysaccharides, sachant que l'épaule apparent vers 1400  $\text{cm}^{-1}$  est dû sans doute à un problème du recollement des différentes régions spectrales enregistrées. D'autre part, la bande à 1100  $\text{cm}^{-1}$  est partiellement attribuée aux polysaccharides. Ce qui reflète une augmentation de la quantité des polysaccharides par rapport aux protéines, et peut être associée à une production plus importante d'EPS riches en polysaccharides dans les biofilms. Nous avons récemment publié des résultats similaires et nous attribuons les différences spectrales à une composition différentielle des EPS selon l'état planctonique et sessile de bactéries [150]. Une telle différence de la composition des EPS entre bactéries planctoniques et sessiles a été rapportée dans la littérature pour des bactéries *P. fluorescens* B52 [63]. Afin de déterminer la nature des polysaccharides produits par les



bactéries, nous avons comparé la signature Raman de biofilms de *P. fluorescens* à celle de plusieurs polysaccharides (Figure IV.12).

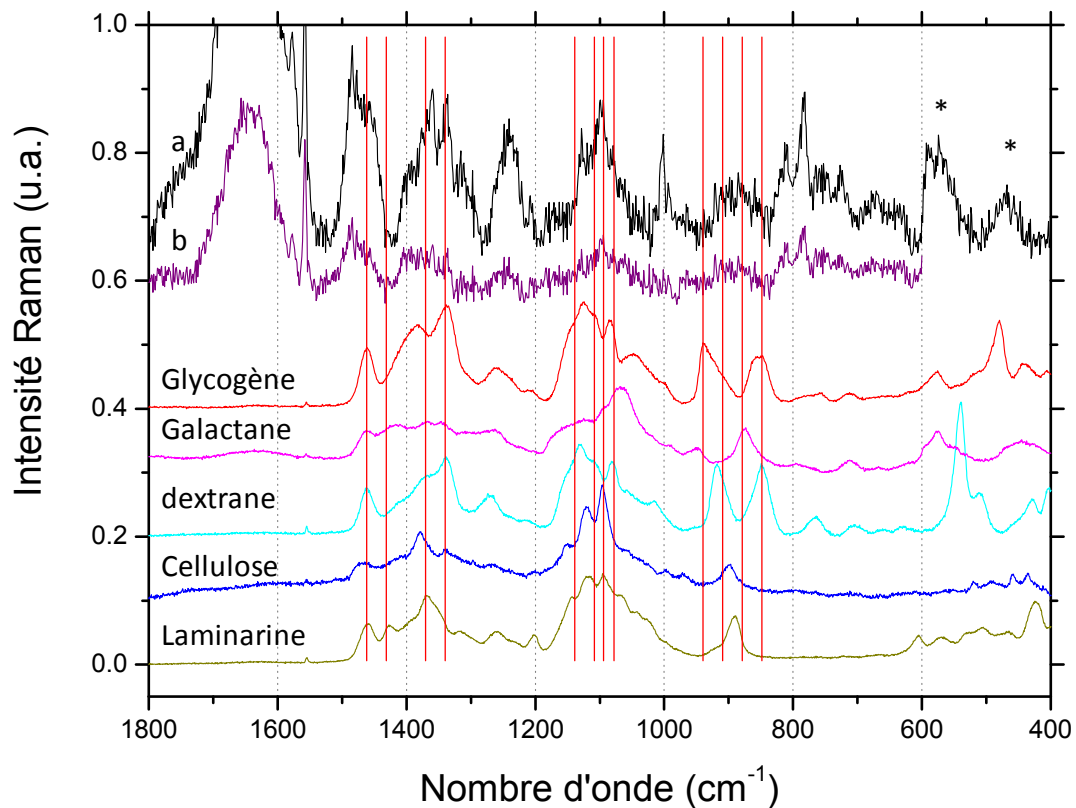


Figure IV.12 : Spectres Raman (a) d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h,  $\lambda_{\text{ex}}$  : 488 nm (réseau à 1200 traits), (b) différence présenté en Figure IV.11, de glycogène ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 488 nm, goutte d'une solution 5mg/mL séchée à l'air), de galactane ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 514 nm, goutte d'une solution 1mg/mL séchée à l'air), de dextrane ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 530 nm, en poudre), de cellulose ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 530 nm, en poudre) et de laminarine ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 530 nm, en poudre). Réseau à 1800 traits. (\* : bandes du support en Ge)

Les polysaccharides présentent des bandes essentiellement dans trois régions spectrales : 1500-1300 cm<sup>-1</sup>, 1200-950 cm<sup>-1</sup> et 950-700 cm<sup>-1</sup>. Cependant, vu l'intensité de la signature des acides nucléiques, les bandes des polysaccharides sont noyées par cette dernière surtout dans les régions autour de 1483 et de 1100 cm<sup>-1</sup>. On peut toutefois voir dans le spectre du biofilm ainsi que dans le spectre de différence que certaines bandes de polysaccharides sont présentes notamment dans les régions autour de 1350, 1100 et 900 cm<sup>-1</sup>. Même si les spectres seuls ne permettent pas d'identifier précisément la présence de tel ou tel polysaccharide, ils témoignent toutefois de la complexité des polysaccharides produits. Afin de mieux caractériser les polysaccharides produits dans un biofilm, il serait intéressant d'utiliser un autre support que

celui en germanium qui présente malheureusement des bandes en dessous de  $600\text{ cm}^{-1}$ . Or, cette région spectrale renferme des informations utiles sur certains polysaccharides.

Nous avons observé dans les spectres IR une légère augmentation de l'intensité de la bande d'élongation antisymétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$  des phospholipides et des acides nucléiques dans le cas du biofilm par rapport aux bactéries planctoniques, sans pouvoir toutefois l'attribuer précisément. Or, dans les spectres Raman, nous avons observé une nette augmentation des bandes attribuées aux acides nucléiques, ce qui permet d'attribuer l'augmentation en intensité dans les spectres IR essentiellement aux acides nucléiques. De même, les spectres Raman et IR ont montré une augmentation des polysaccharides à l'état sessile par rapport à l'état planctonique. Dans les deux cas, la signature spectrale seule ne permet pas d'identifier un polysaccharide, témoin de la complexité des polysaccharides produits. Sachant que l'information révélée dans les spectres Raman est beaucoup plus localisée par rapport à celle révélée dans les spectres IR, il semble que le métabolisme bactérien au sein du biofilm soit homogène à ce stade de développement.

### **1.3. Etude *in situ* par SMFS des propriétés conformationnelles des EPS produites par un biofilm de 24 h de *P. fluorescens* formé dans des conditions standard de croissance**

Les spectroscopies vibrationnelles IR-Raman ont permis de détecter la production des polysaccharides intra et / ou extracellulaires. Mais, nous ne pouvons pas à ce stade déterminer précisément leur nature. Les images à épifluorescence ont mis en évidence la présence des EPS à base de glucose et/ ou mannose. D'où, nous avons réalisé des mesures par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, spécifique du glucose et du mannose permettant de détecter spécifiquement les macromolécules avec ces résidus terminaux respectivement. Nous avons analysé différentes régions à la surface du cristal, nous présentons dans la suite les résultats obtenus sur une région qui sont représentatives de l'ensemble des données soit au moins trois cartographies par échantillon. La Figure IV.13 montre les cartographies de hauteur et de forces d'adhésion de la région considérée.

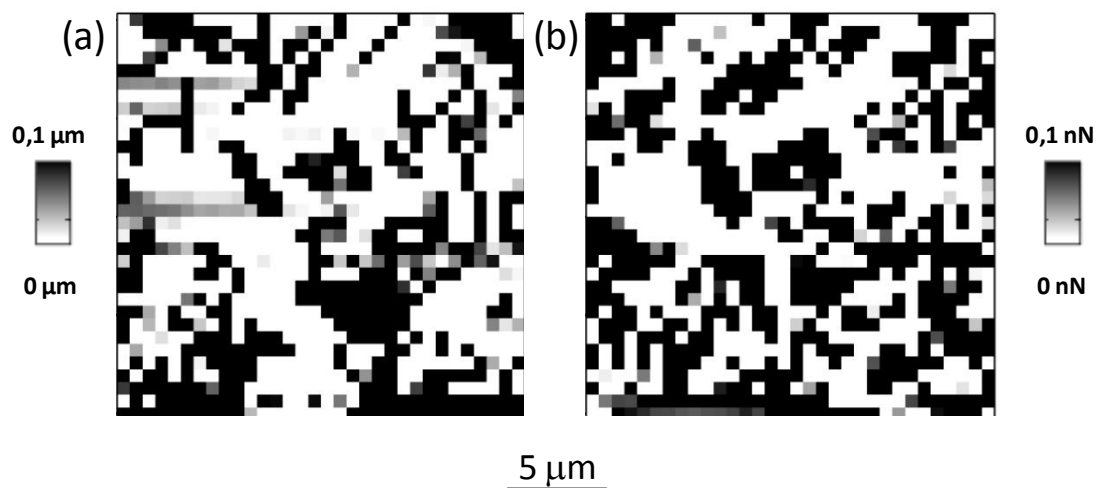


Figure IV.13 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20 µm de la surface d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h

On observe sur la cartographie de hauteur la présence de différents amas de bactéries. En outre, la cartographie de forces d'adhésion montre des forces maximales au niveau de ces amas. La Figure IV.14 montre des exemples représentatifs de courbes de force expérimentales (courbes noires) obtenues sur cette région.

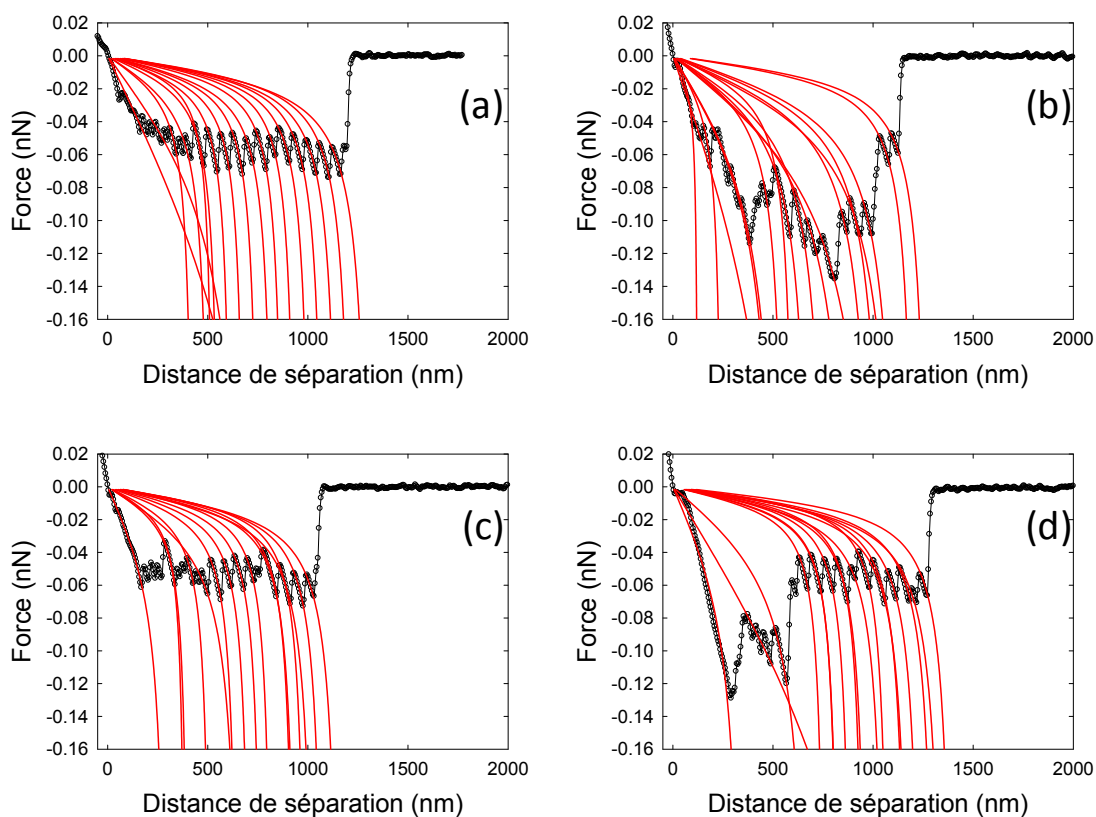


Figure IV.14 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) obtenues à différents endroits d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA.

L'analyse du comportement non-linéaire de la courbe de retrait d'une courbe de force permet d'étudier les interactions moléculaires entre les polymères à la surface de l'échantillon et les molécules fixées à la sonde AFM [285]. En effet, et dans le cas d'interaction unique, sous l'action de la force d'extension appliquée par la sonde, le polymère sera étiré jusqu'à ce que la force d'étirement soit supérieure à la force d'adhésion. L'allongement du polymère est accompagné par la rupture des interactions intramoléculaires et le dépliement de sa structure. Ces différentes transitions sont repérables sur les courbes de force [286] et correspondent à des pics dont l'amplitude est la force nécessaire pour rompre l'interaction correspondante. Le dernier pic est attribué à la séparation physique des deux entités et donc à leur force d'adhésion. Or, l'interaction sonde-échantillon fait intervenir souvent plusieurs chaînes qui peuvent ou non être d'un seul polymère, et un pic peut correspondre soit à l'élongation d'un polymère soit au détachement moléculaire d'un des fragments en interaction avec la sonde AFM. On remarque dans la Figure IV.14 la présence de motifs en dent de scie sur les courbes de force. Ces différents pics sont caractéristiques de déploiements moléculaires séquentiels [150, 287-289] ou de détachements moléculaires successifs des macromolécules liées spécifiquement à la lectine ConA [287, 289]. On relève que les pics successifs sont caractérisés par des forces faibles de l'ordre de 0,05 à 0,12 nN. En outre, les élongations mesurées peuvent atteindre jusqu'à 1500 nm. Ceci démontre que les macromolécules étirées sont particulièrement longues. Le nombre important de pics par courbe de force (entre 0 et 15) traduit un taux d'enchevêtrement important et/ou un taux de ramifications important des macromolécules [150].

Les courbes expérimentales ont par la suite été analysées par les modèles théoriques FJC et WLC, caractéristiques respectivement du comportement mécanique des polysaccharides et des protéines sous étirement. Brièvement, ces deux modèles mettent en équation la relation entre la force d'étirement et la distance à partir de laquelle aura lieu la rupture entre la macromolécule et la sonde (**cf. chapitre II**). De ces équations, huit paramètres ont été calculés et examinés, ceux-ci représentant des propriétés conformationnelles et mécaniques des macromolécules. Ces paramètres sont : 1) le nombre de ruptures par courbe de force, 2) le nombre de monomères, 3) la longueur de contour  $L_c$ , 4) la longueur de la dernière rupture  $L_{max}$ , 5) les longueurs de Kuhn  $l_k$  et 6) de persistance  $l_p$  calculées respectivement avec les modèles FJC et WLC et qui reflètent la rigidité des polymères, 7) la distance entre deux pics successifs  $\delta L$  et 8) la force d'adhésion  $F_{adh}$  qui correspond à l'amplitude de la dernière

rupture. Seuls le nombre de monomères et la mesure de la rigidité des macromolécules sont différents selon le modèle d'analyse adopté. La Figure IV.15 montre des exemples de courbe de force-distance avec les ajustements théoriques selon les modèles FJC (courbes rouges) et WLC (courbes bleues).

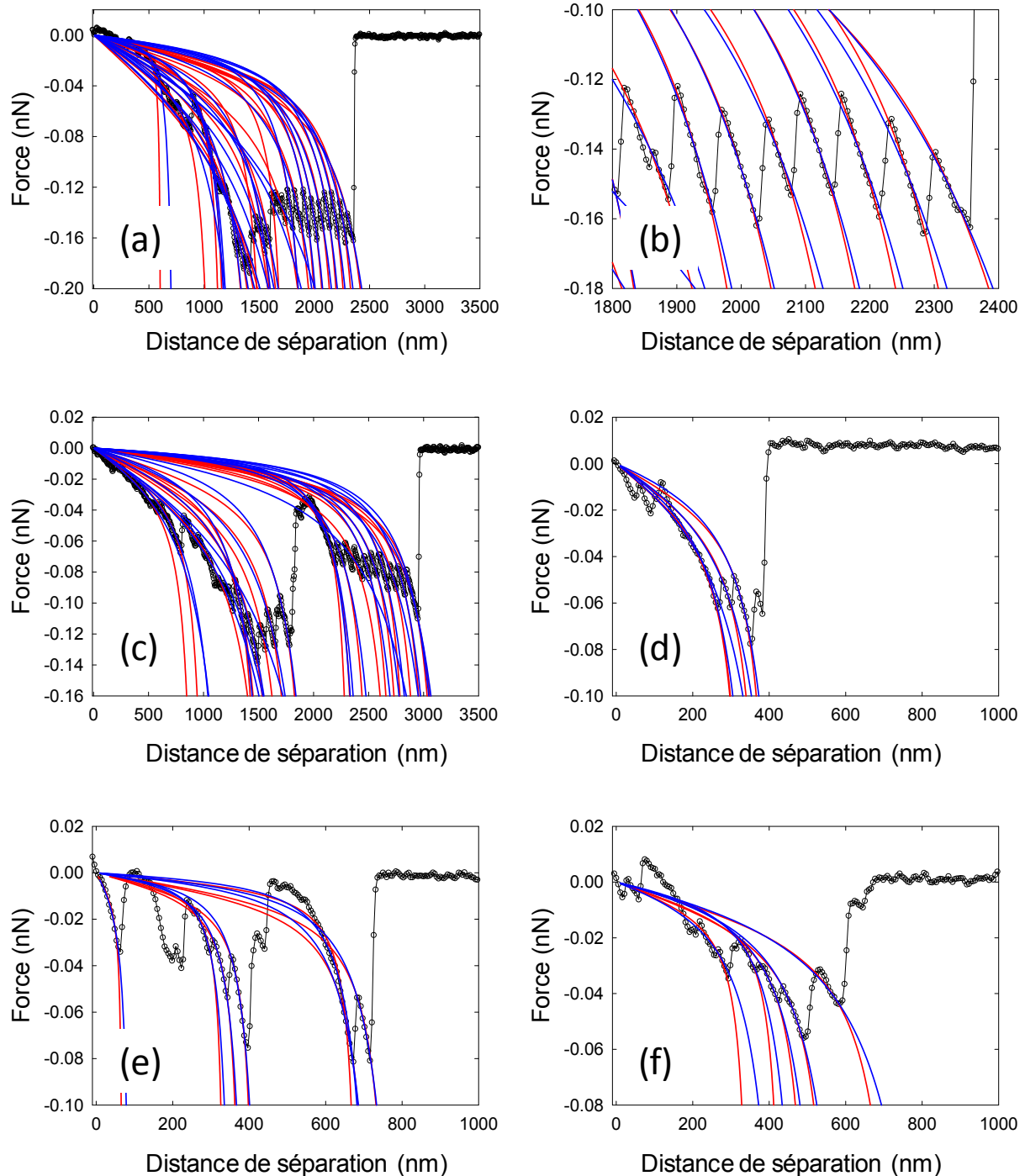


Figure IV.15 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA sur un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h. Les courbes rouges et bleues correspondent à l'ajustement des courbes expérimentales selon les modèles théoriques FJC et WLC respectivement. (a, b, c) Exemples

correspondants à différentes régions de la surface analysée. (d, e, f) Agrandissement de zones d'intérêt respectivement des courbes a, b et c.

La **Figure IV.15** montre que le modèle FJC est meilleur dans certains cas en termes d'ajustement aux courbes expérimentales, alors que dans d'autres cas, c'est le modèle WLC. L'aptitude de chaque modèle à décrire les résultats expérimentaux a été évaluée à l'aide du paramètre d'optimisation  $q_{min}$  (c.f. chapitre II). Plus ce paramètre est faible, meilleure est la modélisation théorique.

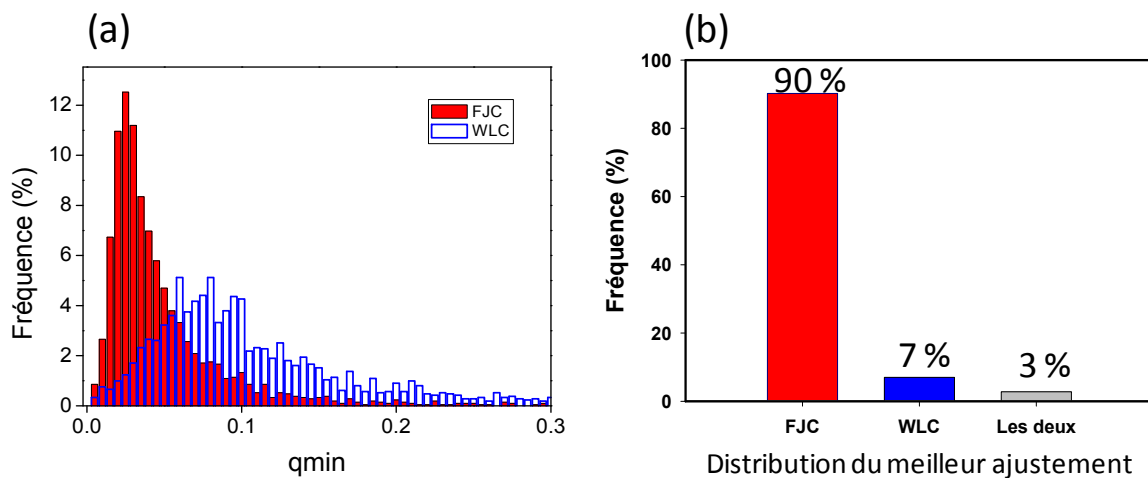


Figure IV.16 : (a) Distribution des valeurs  $q_{min}$  calculées pour les modèles FJC et WLC, (b) distribution du meilleur ajustement par FJC et WLC. Les deux modèles sont considérés équivalents quand la différence de la qualité d'ajustement est inférieure à 5%.

D'après la distribution des résidus  $q_{min}$ , l'ajustement selon le modèle FJC est meilleur dans 90 % des cas. Le fait que dans 7 % des cas l'ajustement est meilleur selon le modèle WLC suggère la présence d'une proportion de segments protéiniques dans les exopolymères étirés. Les macromolécules détectées par la sonde fonctionnalisée avec la ConA sont donc majoritairement de type polysaccharide strict et dans quelques cas de nature plutôt glycoprotéinique. Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons rapporté sur des biofilms de *P. fluorescens* formés dans des conditions similaires où l'ajustement théorique était meilleur selon le modèle FJC dans 75 % de cas [150].

Par la suite, nous avons conduit un traitement statistique des 1024 courbes de force afin d'extraire les propriétés conformationnelles des polymères ainsi détectés. Les Figure IV.17 et Figure IV.18 montrent les distributions statistiques correspondantes.

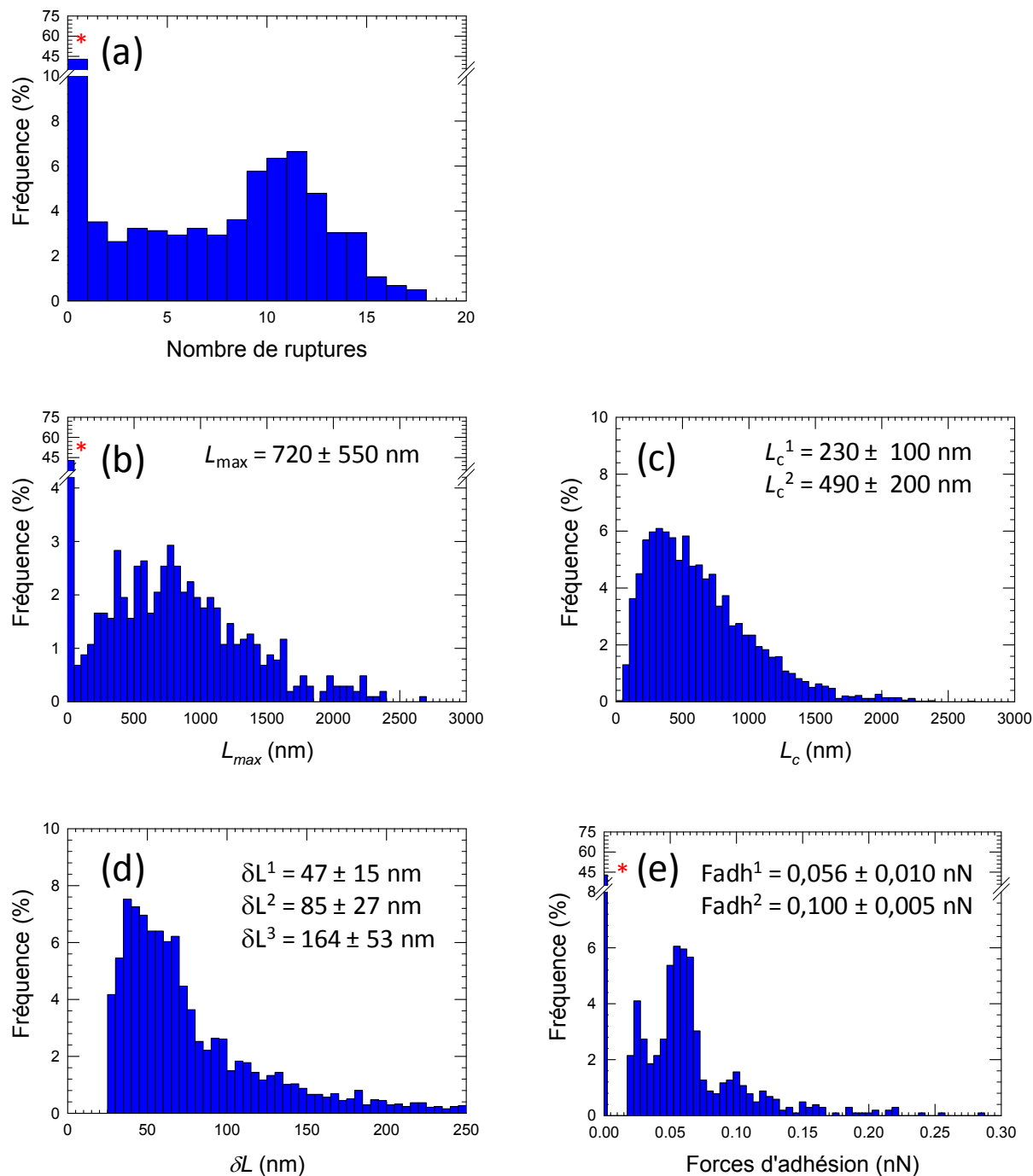


Figure IV.17 : Propriétés conformationnelles des macromolécules riches en glucose / mannose d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé à pH 7. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA : (a) nombre de ruptures, (b) longueur de la dernière rupture  $L_{max}$ , (c) longueur de contour  $L_c$ , (d) distance entre deux pics successifs  $\delta L$ , (e) forces d'adhésion. \* : pourcentage à zéro de 41 %

La Figure IV.17 montre que 41% des courbes de force ne présentent aucun évènement de rupture (pourcentage à zéro), cela signifie que les EPS riches en glucose/mannose ont été détectées sur 59% de la zone étudiée. L'analyse du nombre d'évènements de rupture par courbe, qui varie entre 1 et 17, montre une distribution bimodale (Figure IV.17.a). Les valeurs les plus fréquentes se situent entre 7 et 13 ruptures par courbe de force. Cette distribution est moins large que ce qui a été rapporté sur l'étude de bactéries planctoniques où ce paramètre variait entre 2 et 25 avec les valeurs les plus fréquentes de l'ordre de 10 et 17 ruptures par courbe de force [141, 200].

Par ailleurs, les valeurs de  $L_c$  montrent une distribution trimodale allant de 100 à 2000 nm avec des valeurs les plus fréquentes autour de 230 et 490 nm (Figure IV.17.c). Par contre, les valeurs de  $L_{max}$  présentent une distribution large et asymétrique allant jusqu'à 2500 nm avec des valeurs plus fréquentes autour de 720 nm. Ces valeurs sont un peu inférieures à celles que nous avons rapportées dans des conditions similaires [150]. Cependant, on retrouve une valeur moyenne des  $L_{max}$  qui est 2 à 3 fois plus importante que celle des  $L_c$ . Cette différence entre les valeurs les plus fréquentes de  $L_{max}$  et  $L_c$  suggère que les macromolécules étirées sont hautement repliée et / ou ramifiée.

La modélisation montre que les macromolécules seraient constituées d'un nombre important de monomères qui peut atteindre 50000 ou 60000 selon les modèles FJC ou WLC respectivement, avec les valeurs les plus fréquentes de l'ordre de 1600 et 3400 monomères selon le modèle FJC et de 3300 selon le modèle WLC. (Figure IV.18.a et b). Ces résultats sont en accord avec nos travaux précédents concernant le biofilm de *P. fluorescens* dans des conditions similaires [150]. Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles rapportées pour des mesures similaires réalisées sur bactéries planctoniques [141]. D'autre part, l'étendue de la distribution de 5 à 6 fois plus importante que celle observée dans le cas des bactéries planctoniques [141] témoigne d'une plus grande hétérogénéité des EPS dans le cas du biofilm.



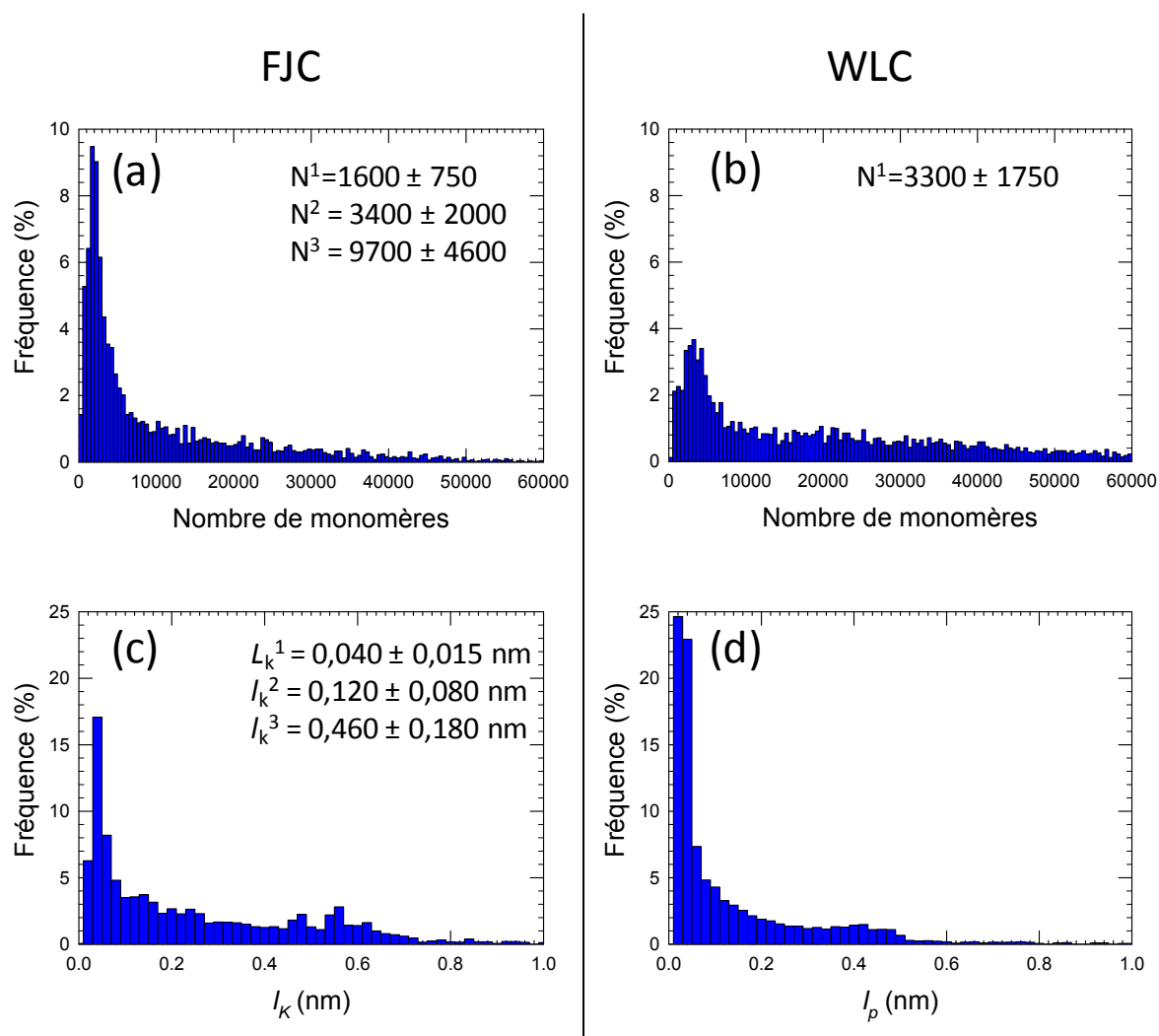


Figure IV.18 : Nombre de monomères (a, b) et longueurs de Kuhn,  $l_k$  (c) et de persistance  $l_p$  (d) des macromolécules riches en glucose d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé dans du LB/50 à pH 7. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, (a, c) modèle FJC, (b, d) modèle WLC

La distribution des longueurs de Kuhn est asymétrique et large (Figure IV.18.c). Elle montre trois maximums à 0,04, 0,12 et 0,46 nm. Nous attribuons la première valeur à l'élongation d'un monomère de sucre suite à une transition conformationnelle de la position de la liaison C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>. L'élongation associée à cette transition est de l'ordre de 0,06 nm [286]. La deuxième valeur est voisine de la taille de la longueur d'une liaison C-C [286, 290]. La troisième valeur de 0,48 nm peut être attribuée à un assemblage de deux sucres. En effet, la longueur de Kuhn approximative pour un monomère équivalent à un sucre est de l'ordre de 0,24 nm [141, 200]. Une longueur de Kuhn comprise entre 1,2 et 1,4 nm a été calculée pour des exopolymères de

*Lactobacillus rhamnosus* [211]. Une telle valeur a été attribuée à la taille d'un monomère des EPS excrétées par *L. rhamnosus* qui correspond à un assemblage de six sucres [291, 292].

La distribution des longueurs de persistance  $l_p$  calculées par le modèle WLC montre des valeurs allant de 0,01 à 0,8 nm, avec un maximum à 0,04 (Figure IV.18.b). Cette valeur est voisine de ce que nous avons rapporté précédemment dans des conditions similaires [150]. Elle peut être attribuée aux faibles déformations des tours à l'intérieur de la structure hélicoïdale des protéines [293, 294]. Les valeurs allant de 0,15 à 0,8 peuvent être attribuées à un pas typique des hélices  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi qu'à la taille d'un acide aminé qui est de l'ordre de 0,15 à 1,2 nm [295-297]. Ces résultats appuient les hypothèses extraites à partir de la modélisation théorique par les modèles FJC et WLC (Figure IV.15) et suggèrent la présence de segments peptidiques au sein de la structure des exopolymères étirés par la sonde AFM.

La Figure IV.17.d représente la distribution statistique des distances moyennes entre deux événements de rupture successifs ( $\delta L$ ). Ce paramètre correspond dans le cas d'un polymère ramifié ou à structure fractale, à la distance moyenne séparant deux ramifications successives comme nous l'avons montré dans des travaux précédents [141]. Il permet en outre d'estimer un degré d'enchevêtrement ou de ramification des macromolécules. On remarque que les valeurs de  $\delta L$  présentent une distribution trimodale avec des valeurs caractéristiques de 47, 85 et 164 nm. Cette distribution montre ainsi l'absence d'une périodicité des ramifications au sein des macromolécules détectées. On note toutefois que pour les bactéries planctoniques, les valeurs de  $\delta L$  montrent une distribution trimodale caractéristique avec 3 maximums à 30 nm, 60 nm et 90 nm ce qui correspond à une périodicité de 30 nm [141, 200]. Le rapport  $L_{\max}/\delta L$  reflète le taux de ramification des macromolécules étirées, il est de l'ordre de 15 (720/47) reflétant une structure hautement ramifiée.

La Figure IV.17.e montre la distribution des forces d'adhésion, celle-ci est large et asymétrique avec des valeurs arrivant jusqu'à 0,250 nN. Les valeurs les plus fréquentes sont autour de 0,056 et 0,100 nN. La première valeur est proche de celle caractéristique d'une interaction unique entre une molécule de ConA et un résidu de glucose qui est de l'ordre de 0,060 nN [285]. La deuxième valeur est proportionnelle au nombre de macromolécules riches en glucose/mannose qui interagissent simultanément avec la sonde AFM, nous détectons donc le détachement simultané de deux molécules de glucose/ mannose de la sonde. Ces résultats

sont en accord avec ce qui a été mesuré lors de travaux antérieurs sur un biofilm formé sous condition de pH non contrôlé [150]. Sachant par ailleurs, que l'extrémité de la sonde AFM peut comporter jusqu'à 5 molécules de ConA, et qu'une molécule de ConA renferme quatre sites d'interaction avec les résidus glucose/mannose ; il est fort probable que nous ayons des interactions multiples liées à la rupture simultanée de plusieurs liaison sucre-ConA. Cela signifie que les valeurs obtenues dérivent de la rupture simultanée de 1 à 3 molécules interagissant avec la sonde AFM à la dernière rupture.

Les macromolécules étirées sont essentiellement localisées au niveau des cellules bactériennes (Figure IV.13). Ils peuvent correspondre à des structures de surface comme à des EPS libérées dans la matrice. En revanche, nos résultats témoignent de la grande hétérogénéité de ces macromolécules comme les distributions sont larges et asymétriques notamment celles des valeurs de  $L_{max}$ ,  $L_c$  et du nombre de monomères. Ces macromolécules sont particulièrement longues et présentent un nombre important de ramifications qui sont toutefois moins régulières que dans le cas des polysaccharides de bactéries planctoniques. Ces résultats sont en accord avec les données IR et Raman qui ont montré une nature complexe des polysaccharides. Sachant que les polysaccharides sondées en spectroscopies IR et Raman correspondent aux fractions intra et extracellulaires. On peut supposer que la production plus importante dans le cas du biofilm par rapport aux bactéries planctoniques est reliée essentiellement aux polysaccharides extracellulaires. Il faut toutefois noter que compte tenu de la fonctionnalisation des sondes AFM avec la ConA, on n'a détecté qu'une fraction des EPS à savoir celles riches en glucose et/ ou mannose. Des études complémentaires avec des sondes fonctionnalisées avec d'autres lectines sont nécessaires pour cibler différentes EPS sécrétées.

## 2. Biofilm de 24h d'*Escherichia coli* à pH 7

### 2.1. Signature IR des culots bactériens d'*E. coli* planctoniques aux différentes phases de croissance

Afin d'étudier les variations métaboliques en fonction des phases de croissance dans des conditions standard (Figure III.11), nous avons enregistré les spectres IR-ATR à différents temps de croissance. Ceux-ci sont présentés dans la Figure IV.19. Les attributions des bandes IR dans un spectre de culot bactérien sont discutées dans le début de ce chapitre (Tableau IV-1).

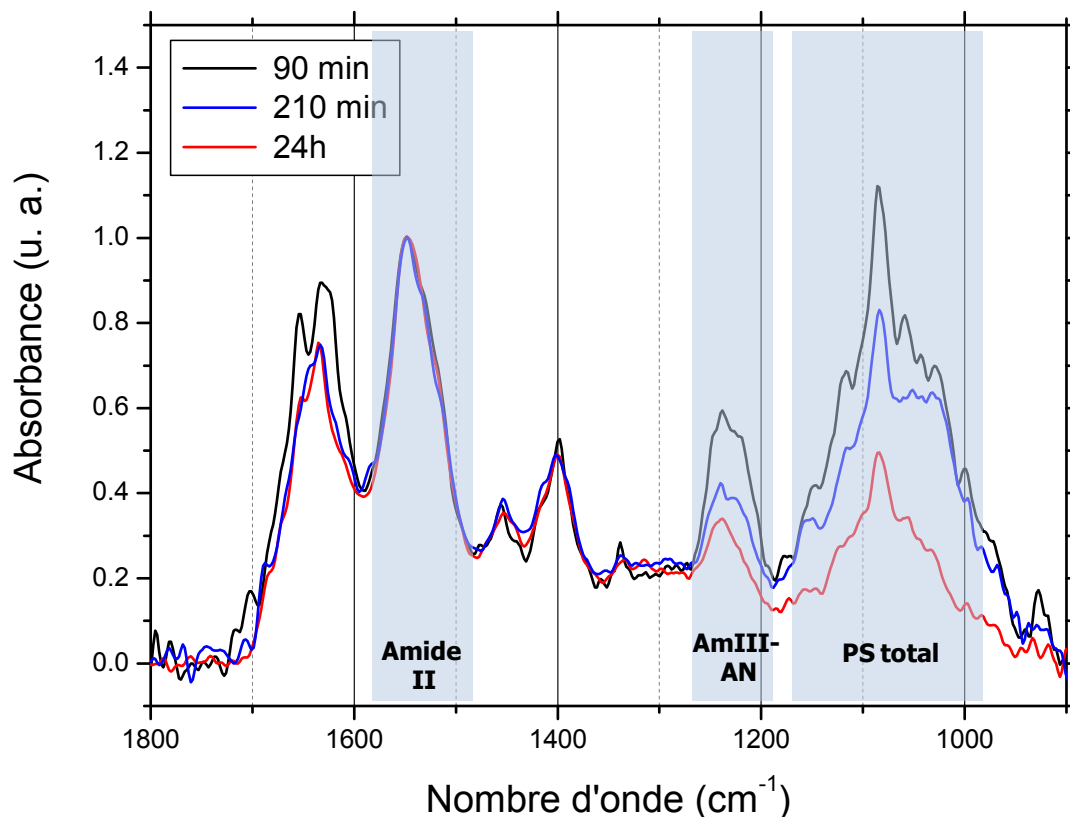


Figure IV.19 : Spectres IR-ATR enregistrés sur un cristal en diamant de culots bactériens d'*E. coli* en phase exponentielle (90 min), phase stationnaire (210 min) et phase de déclin (24 h), cultivés dans du milieu LB 25 g/L. Les spectres sont normés par rapport à la bande Amide II.

On remarque que les intensités relatives des bandes AmIII-AN ( $1233\text{ cm}^{-1}$ ) et PS total ( $1085\text{ cm}^{-1}$ ) sont maximales au cours de la phase exponentielle de croissance par rapport aux protéines. D'autre part, l'intensité relative de la bande AmIII-AN diminue par rapport à celle de la bande Amide II à la phase stationnaire, cela signifie que la contribution des  $\text{PO}_2^-$  des acides nucléiques et des phospholipides devient moindre par rapport aux protéines. Ceci est en accord avec une synthèse maximale des acides nucléiques au cours de la phase exponentielle, durant laquelle les cellules se divisent rapidement [298]. D'autre part, la relative constante du rapport des intensités relatives des bandes AmIII-AN et PS total indique une augmentation au cours du temps de la contribution des polysaccharides dans la bande PS total, ce qui est également confirmé par le changement du profil de cette bande. Ceci reflète une augmentation de la production des polysaccharides durant la phase stationnaire de croissance. La souche UGB 3152 utilisée produit activement du PNAG. Cerca *et al.* [299] ont montré que la production du PNAG est plus importante durant la phase stationnaire de croissance d'une autre souche d'*E. coli*, produisant également cet exopolymère.

## **2.2. Suivi *in situ* par IR-ATR de 24 premières heures de la formation d'un jeune biofilm d'*Escherichia coli***

Comme décrite dans le chapitre II, la formation des biofilms débute avec une étape d'adhésion bactérienne assurée par la circulation à travers la cellule d'écoulement d'une suspension bactérienne nommée  $S_{0-Ec}$ . Cette étape se fait dans des conditions statiques pendant une demi-heure et un flux de 50 mL/h pendant deux heures. La suspension bactérienne est formée dans du milieu nutritif dilué (LB/10). Afin de vérifier la croissance bactérienne à cette concentration en apport nutritifs, nous avons étudié la courbe de croissance bactérienne correspondante, celle-ci est présentée dans la Figure IV.20.a.

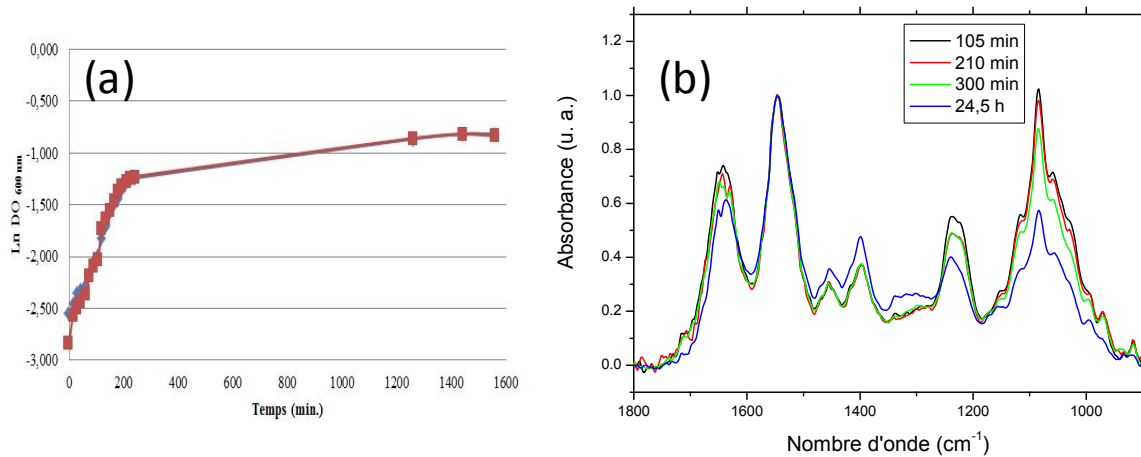


Figure IV.20 : (a) Courbe de croissance de la souche *E.coli* UGB 3152 dans du milieu LB/10, (b) Spectres IR sur un cristal en diamant de culots bactériens d'*E. coli* en phase exponentielle (105 min), phase stationnaire (210, 300 min) et phase de déclin (24 h), cultivés dans du milieu LB/10, les spectres sont normés par rapport à la bande amide II

La courbe de croissance dans du milieu nutritif LB/10 montre une évolution similaire à celle réalisée dans des conditions de croissance standard (LB à 25 g/L, Figure III.11). Par contre, le calcul d'un temps de génération n'a pas été possible à cause de l'allure de courbe de croissance dont la pente est peu/mal définie. Cependant, on peut distinguer clairement les phases exponentielle et stationnaire. Nous avons enregistré les empreintes spectrales aux temps correspondants aux phases : exponentielle, stationnaire et de déclin (Figure IV.20.b). L'évolution des spectres en fonction de la phase de croissance dans un milieu nutritif dilué est similaire à celle observée dans du milieu nutritif standard. Les intensités des bandes attribuées aux polysaccharides, phospholipides et aux acides nucléiques sont maximales à la phase exponentielle, et diminuent durant la phase stationnaire. En revanche, le profil de la bande PS total n'évolue pas de la même manière, reflétant une production de polysaccharides moindre par rapport à la croissance dans de LB. Mais, compte tenu des courbes de croissance et l'évolution des autres bandes, on peut supposer que les bactéries présentent un profil de croissance typique dans du LB dilué à 10%.

L'évolution du profil spectral IR-ATR et des aires intégrées des principales bandes IR durant l'étape d'inoculation bactérienne est présentée dans la Figure IV.21.

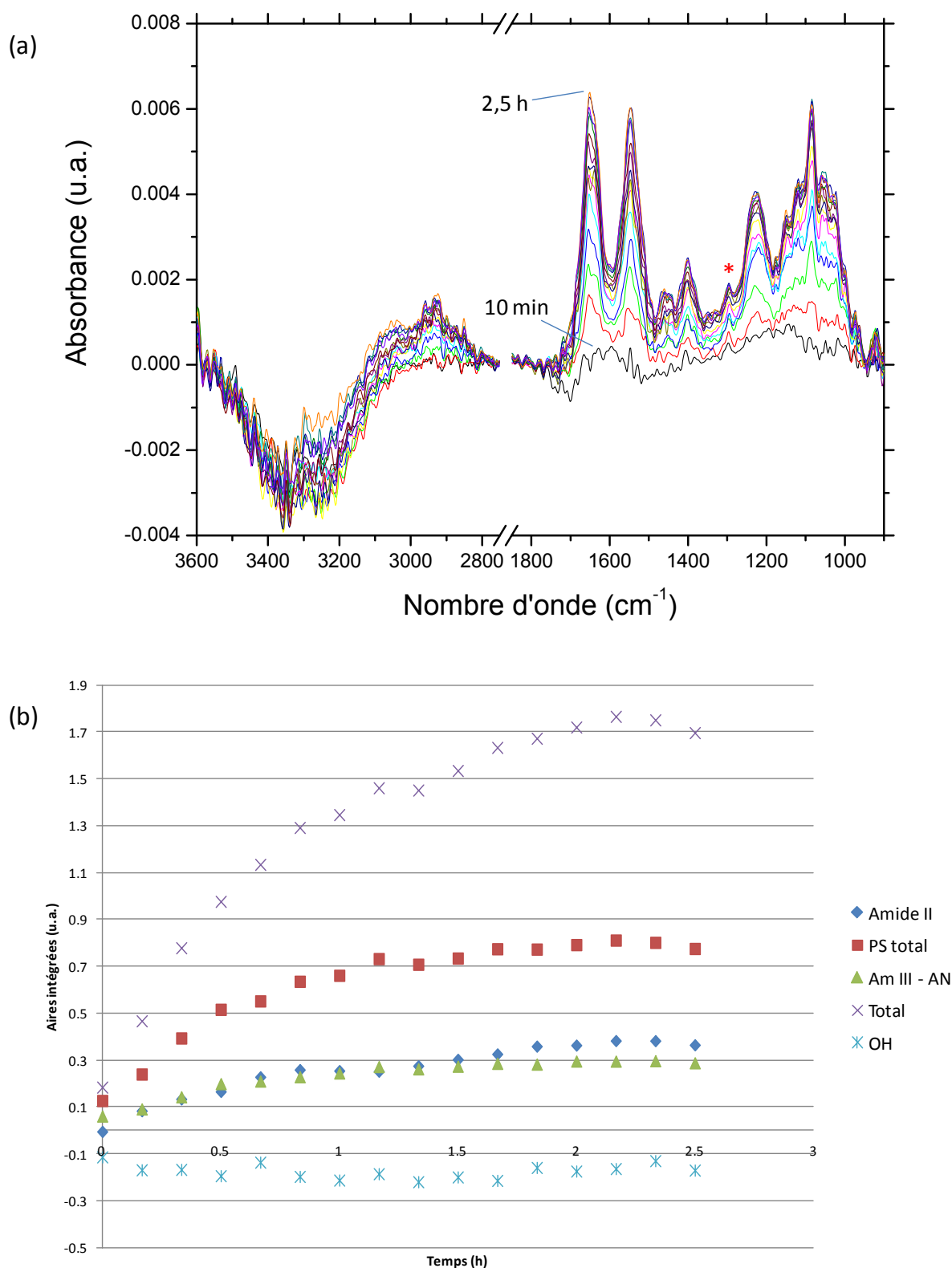


Figure IV.21 : Evolution du profil spectral IR-ATR au cours de l'étape d'adhésion bactérienne : 30 min en mode statique, 2 heures sous un flux de 50 mL/h et (b) Evolution des aires intégrées des principales bandes des spectres IR-ATR. Cristal ATR en germanium. \* : bande attribuée au polydiméthylsiloxane (PDMS) provenant des tuyaux en silicone (cf. chap. II-2.2)

En examinant le profil spectral, on note la présence des bandes témoignant de la présence de quatre groupes de molécules : les protéines, les polysaccharides, les lipides et les acides nucléiques. Ceci confirme l'adhésion des bactéries à la surface du cristal. L'intensité des différentes bandes croît graduellement au cours du temps, ce qui signifie que la colonisation du cristal par les bactéries est progressive. Comme nous l'avons observé dans le cas des biofilms de *P. fluorescens*, les aires intégrées de toutes les bandes IR principales, à part celle de  $\nu\text{OH}$  augmentent en fonction du temps, ce qui reflète l'accumulation de la biomasse bactérienne moins concentrée en eau à la surface du cristal. De même, comme pour *P. fluorescens*, les cinétiques d'adhésion sont caractérisées par la présence des plateaux plus ou moins marqués selon les expériences. Il a été démontré que ces variations n'ont pas des conséquences sur le développement ultérieur des biofilms [118]. A ce stade de la formation du biofilm, les bactéries forment une monocouche à la surface du cristal comme le montre la Figure IV.22, et mesurent en moyenne  $2,00 \pm 0,42 \mu\text{m}$  de longueur et  $0,84 \pm 0,12 \mu\text{m}$  de diamètre. Nous avons calculé un taux de recouvrement de la surface du cristal ATR de l'ordre de 32 %.

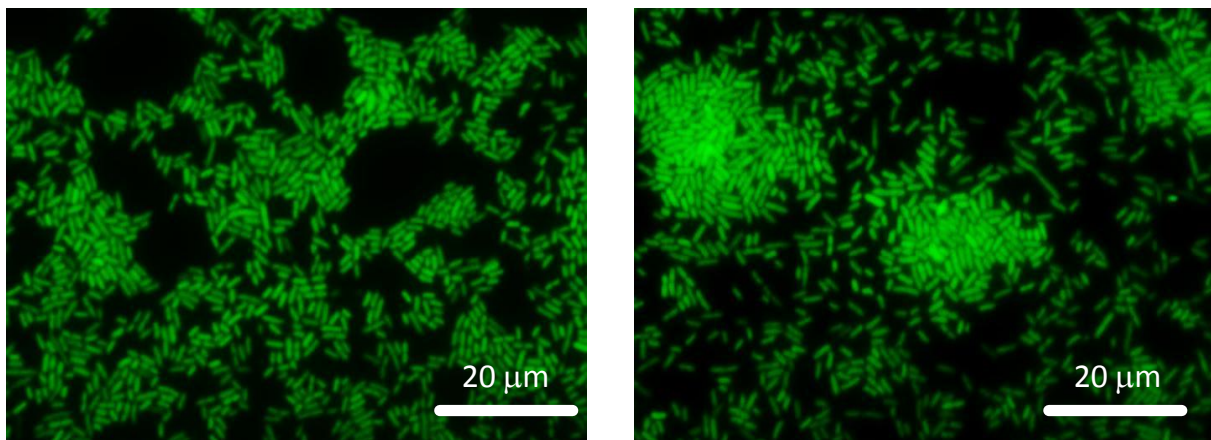


Figure IV.22 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un jeune biofilm de 2,5h d'*E. coli* exprimant la GFP (fluorescence verte) à la fin de la circulation de la suspension bactérienne, les images sont prises à deux régions distinctes de la surface du cristal.

Suite à l'adhésion bactérienne, du milieu nutritif dilué (LB /10) a été mis en circulation pendant 21 heures et 30 minutes, l'évolution des principales bandes IR est présentée dans la Figure IV.23.



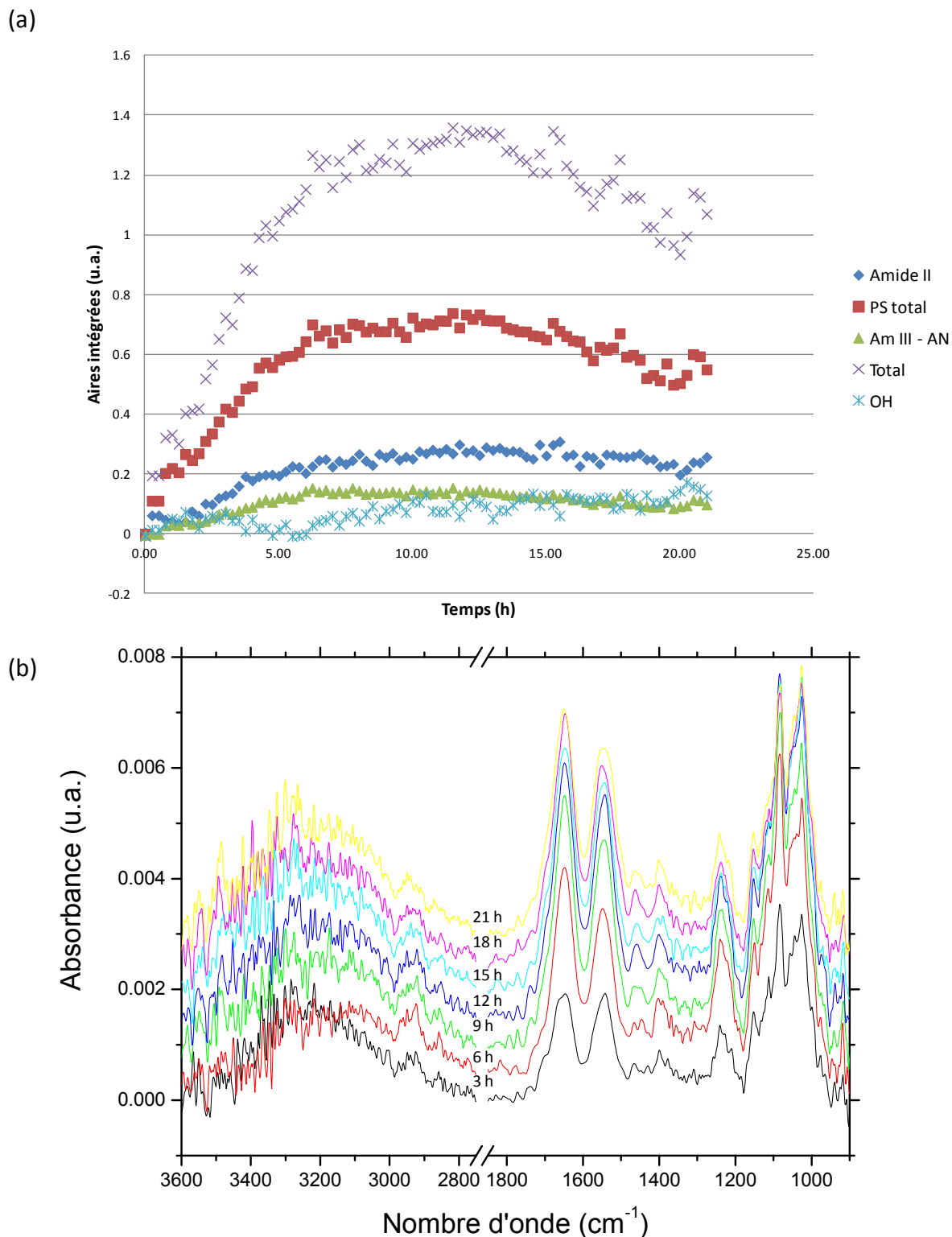


Figure IV.23 : (a) Evolution des aires intégrées des principales bandes IR au cours de la circulation de LB/10. (b) Evolution du profil spectral IR d'un biofilm d'*E. coli* à la surface d'un cristal Ge après 3, 6, 9, 12, 15, 18 et 21 h de circulation du milieu nutritif LB/10. La référence des spectres est le spectre acquis au début de la circulation du milieu LB/10.

En examinant l'évolution des aires intégrées des principales bandes IR, on peut distinguer trois phases : la première phase se situe entre zéro et six heures, elle est caractérisée par une augmentation des aires intégrées des différentes bandes. Cette phase correspond à la division des bactéries à la surface de cristal de germanium et l'accumulation de la masse bactérienne. En revanche, compte tenu de l'évolution du profil spectral, cette phase est également caractérisée par une production importante de polysaccharides.

La deuxième phase se situe entre six et 15 heures, et est caractérisée par la stabilisation des aires intégrées des principales bandes IR. Ce plateau peut être expliqué comme dans le cas des biofilms de *P. fluorescens* par la stabilisation de la biomasse dans le premier micromètre adjacent à la surface du cristal. La troisième phase se situe entre 15 et 21h, elle est caractérisée par la diminution progressive des aires intégrées des bandes PS total et AmIII-AN alors que la bande amide II associée aux protéines varie peu en intensité. Cette diminution peut être associée à une diminution de la production des acides nucléiques, reflétant ainsi une réduction de l'activité métabolique des bactéries [65], ainsi qu'à la diminution du signal IR collecté à l'interface cristal / biofilm qui peut être associée soit à un détachement partiel des bactéries de la surface de cristal soit à une restructuration du biofilm, susceptible d'éloigner la masse bactérienne de l'interface. Ce qui est en accord avec la variation de la bande de l'élongation du groupement OH associée principalement avec l'eau, en effet l'aire intégrée de cette bande est positif, reflétant ainsi l'augmentation de la quantité d'eau à l'interface cristal-échantillon. La restructuration du biofilm pourra éventuellement expliquer cette évolution comme la biomasse repoussée loin de la surface du cristal sera remplacée par les molécules d'eau.

A la fin de circulation du LB/10, nous avons étudié la morphologie du biofilm suite au marquage d'un biofilm de 24 h d'*E. coli* avec l'iodure de propidium, marqueur des cellules à membranes endommagées. L'utilisation de ce marqueur est l'équivalent de réaliser le test *BacLight*<sup>TM</sup>, qui n'était pas possible dans ce cas car le SYTO<sup>®</sup> 9 et la GFP émettent une fluorescence verte, ce qui dégrade la qualité des images enregistrées. La Figure IV.24 montre en particulier deux exemples d'images obtenues.

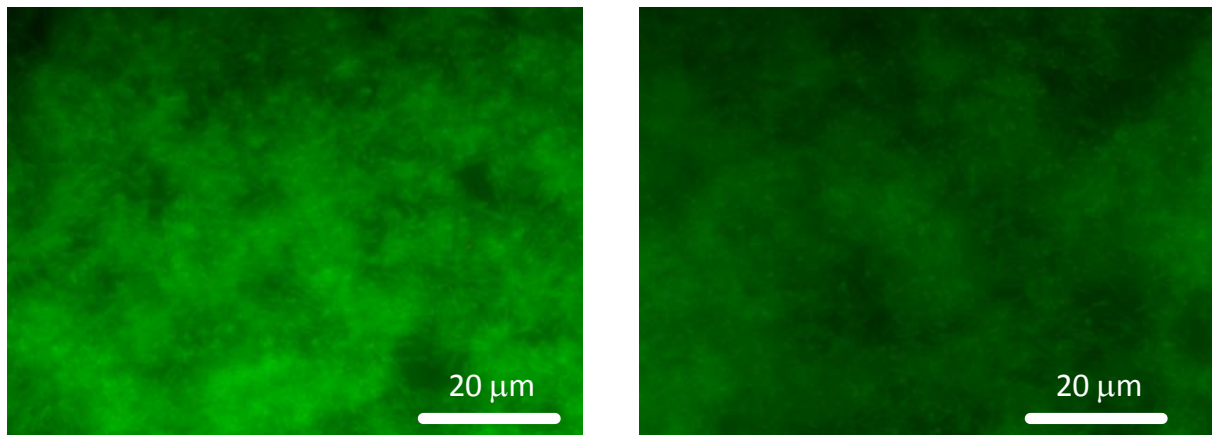


Figure IV.24 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h, exprimant la GFP (fluorescence verte) et marqué à l'iodure de propidium

La structure du biofilm de 24 h est hétérogène avec la présence de régions où les bactéries s'organisent en multicouches, le taux de recouvrement de la surface est de l'ordre de 70 %. On distingue la présence de taches circulaires fluorescentes qui témoignent de la présence de bactéries orientées verticalement. L'adhésion polaire d'*E. coli* durant les premières étapes de formation d'un biofilm a été décrite par Agladze *et al.* [300]. Les images d'épifluorescence montrent un pourcentage très faible de bactéries qui fluorescent dans le rouge (<1%) ce qui prouve que la majorité de bactéries ont des membranes cellulaires intactes.

La souche d'*E. coli* utilisée est génétiquement contrôlée pour sur-exprimer le PNAG. Afin de mettre en évidence cette production, les biofilms de 24 h ont été marqués avec la WGA Alexa Fluor 895<sup>®</sup>. La Figure IV.25 montre deux exemples des images obtenues par microscopie à épifluorescence.

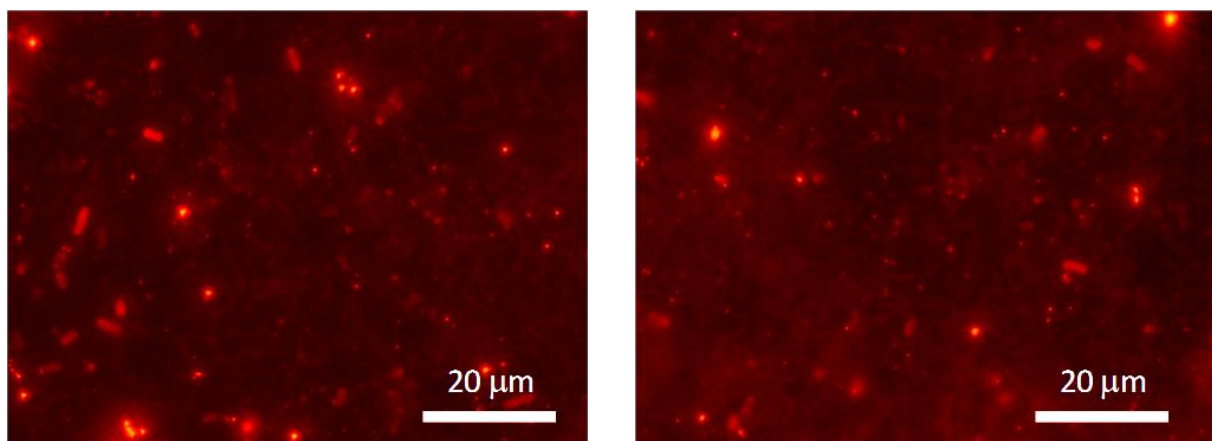


Figure IV.25 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d'*E. coli* marqué par le WGA Alexa Fluor 895 spécifique de PNAG

Une fluorescence rouge importante a été détectée dans les images à épifluorescence mettant en évidence la production de PNAG. La membrane bactérienne étant imperméable à la lectine associée au fluorochrome, le PNAG fait partie de la matrice extracellulaire. Pour étudier les différences physiologiques entre l'état de vie sessile et planctonique, les spectres IR de bactéries planctoniques en fin de phase exponentielle et d'un biofilm de 24 h ont été comparés (Figure IV.26).

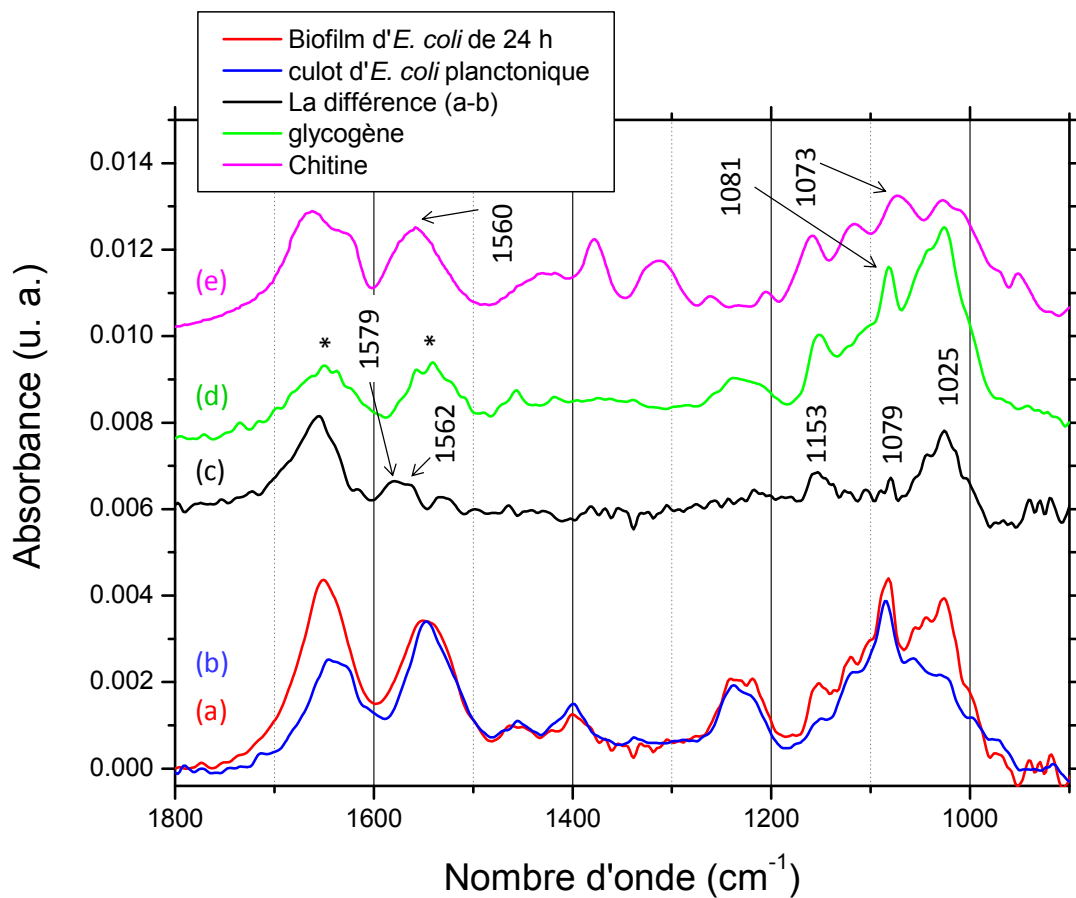


Figure IV.26 : Spectres IR-ATR (a) d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h (crital ATR en germanium), (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries d'*E. coli* planctoniques collectées en fin de phase exponentielle (accessoire ATR en diamant), (c) la différence (a-b) et (d) du glycogène, solution de 5g/L (accessoire ATR en diamant). (e) Spectre IR (en transission) de la chitine \* impuretés protéiques dans le glycogène commercial. Les spectres a et b sont normés par rapport à la bande Amide II.

Comme dans le cas de *P. fluorescens*, la transition planctonique-sessile est accompagnée par plusieurs variations dans les profils spectraux. Notamment, la bande amide II présente une largeur à mi-hauteur plus importante dans le spectre du biofilm. Les spectres diffèrent

également au niveau de la région des polysaccharides et des vibrations des groupements  $\text{PO}_2^-$  ( $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ). Sachant que les épaisseurs sondées sont différentes compte tenu des cristaux ATR utilisés, et que l'organisation de bactéries à la surface du cristal dépendra de leur état, la comparaison des spectres est très délicate. Mais le spectre de différence permet de donner une première idée sur les variations spectrales pourront être reliées à l'état bactérien. Il montre des bandes à  $1153$ ,  $1079$  et  $1025 \text{ cm}^{-1}$ . L'absence de la bande à  $1085 \text{ cm}^{-1}$  peut être associée avec une contribution moindre des acides nucléiques par rapport aux polysaccharides dans le cas du biofilm et donc à une production moins importante des acides nucléiques compte tenu qu'on n'observe pas une bande vers  $1220 \text{ cm}^{-1}$  des groupements  $\text{PO}_2^-$ . Les bandes observées dans cette région spectrale dans le spectre de différence sont attribuées principalement aux vibrations des polysaccharides. Mais on ne distingue ni la signature du glycogène ni celle du PNAG [301]. Cela n'exclut toutefois pas leur production. *E.coli* est connue pour produire du glycogène intracellulaire qu'elle utilise comme source d'énergie [302-304]. En outre, cette souche sur-exprime le PNAG, l'absence de sa signature dans le spectre de différence peut refléter un taux de production proche à l'état planctonique et à ce stade du développement du biofilm. D'autant que la production du PNAG dans le biofilm est révélée par les images à épifluorescence (Figure IV.25)

### 2.3. Signature Raman des biofilms d'*Escherichia coli* de 24 h

L'étude des biofilms d'*E. coli* par MRC a été conduite sous les mêmes conditions utilisées pour l'étude de ceux de *P. fluorescens*. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre III, la signature Raman d'*E. coli* n'est pas influencée par la longueur d'onde d'excitation utilisée à cause de son déficit en cytochrome *c* et par suite l'absence d'un effet Raman de résonance, ce qui permet de comparer les spectres enregistrés avec différentes longueurs d'onde. La Figure IV.27 montre des spectres Raman enregistrés à différents endroits d'un biofilm de 24 h d'*E. coli*, et d'un culot partiellement hydraté de bactéries d'*E. coli* en fin de phase exponentielle.

On remarque que les spectres enregistrés sur le même échantillon présentent des variations au niveau des intensités relatives des bandes. Ces variations peuvent être liées à des variations locales de la composition chimique totale reflétant l'hétérogénéité de l'échantillon. Notons toutefois que ces variations sont relativement minimales dans le cas du culot des bactéries

planctoniques, ceci est en accord avec un état plutôt homogène en fin de la phase exponentielle de croissance.

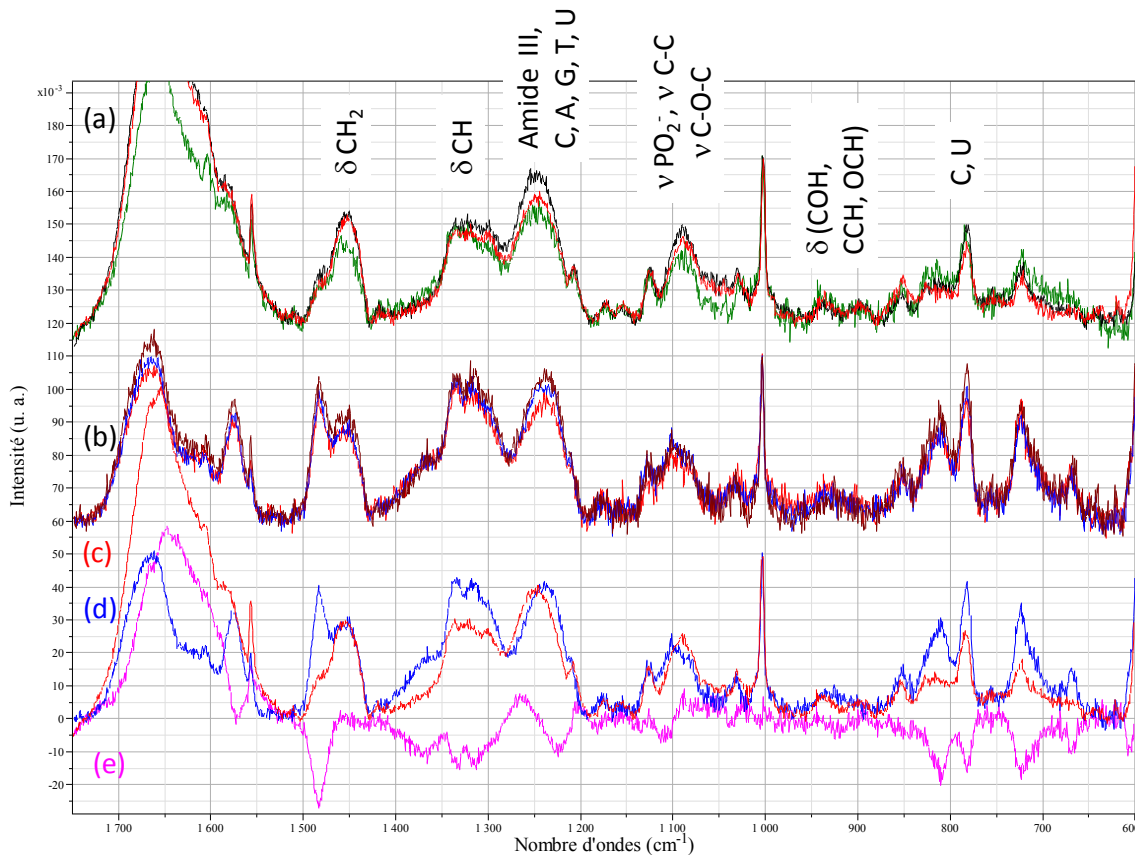


Figure IV.27 : Spectres Raman (a) d'un biofilm hydraté de 24 h d'*E.coli* ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 530 nm, réseau à 1800 traits) et (b) d'un culot partiellement hydraté de bactéries d'*E. coli* planctoniques collectées en fin de phase exponentielle ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 514 nm, réseau à 1200 traits). Spectre moyen (c) de spectres du biofilm, (d) de spectre d'*E. coli* planctoniques, (e) la différence c-d. Les spectres sont normés par rapport à la bande à  $1003 \text{ cm}^{-1}$  de la phénylalanine

Par contre, la comparaison des spectres des bactéries planctoniques et du biofilm montre des différences importantes au niveau des intensités relatives des bandes, ces variations sont visibles sur le spectre de différence (Figure IV.27.e). On observe que, contrairement au cas de *P. fluorescens*, ce spectre montre les bandes des acides nucléiques en négatif notamment, les bandes à  $1575, 1483, 811, 780, 720$  et  $666 \text{ cm}^{-1}$ , reflétant une contribution moindre des acides nucléiques par rapport aux protéines, ce qui suggère une production moins importante des acides nucléiques dans le biofilm de 24h. Par ailleurs, on trouve une bande positive à  $1266 \text{ cm}^{-1}$  et un massif de  $1040$  à  $1095 \text{ cm}^{-1}$ . La première résulte probablement du léger décalage de la bande amide III vers les nombres d'onde supérieurs observé dans le spectre du biofilm, la deuxième bande est attribuée principalement aux polysaccharides, elle est associée avec un

changement du profil de la bande vers  $1100\text{ cm}^{-1}$  dont le maximum se déplace à  $1088\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre du biofilm. Ces variations reflètent notamment une contribution plus importante des polysaccharides par rapport aux acides nucléiques et aux protéines dans les spectres du biofilm, ce qui est en accord avec les résultats IR (Figure IV.26.).

Nous n'avons pas le spectre Raman du PNAG, on peut toutefois faire une comparaison par rapport à celui du N-acétylglucosamine, ce dernier présente des bandes à  $1088$  et  $1055\text{ cm}^{-1}$  attribuées aux vibrations C-O-H [305]. Une production plus importante du PNAG à l'état sessile peut expliquer l'apparition des bandes en positif vers  $1040$  et  $1095\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre de différence. Le spectre du N-acétylglucosamine présente également une bande à  $1266\text{ cm}^{-1}$ , une contribution de cette dernière à l'amide III peut éventuellement expliquer son décalage dans les spectres du biofilm. D'autre part, l'amide III du N-acétylglucosamine est vers  $1327\text{ cm}^{-1}$ , ceci est en accord avec l'augmentation de l'intensité de la bande à  $1325\text{ cm}^{-1}$  par rapport aux protéines observée dans le spectre du biofilm. En particulier, l'intensité vers  $1325\text{ cm}^{-1}$  augmente par rapport à la bande à  $1335\text{ cm}^{-1}$ . On peut attribuer ces observations à une production plus importante du PNAG à l'état sessile.

Les informations obtenues à partir des spectres IR et Raman suggèrent une production plus importante des polysaccharides par rapport aux protéines et aux acides nucléiques à l'état sessile. Mais les résultats Raman montrent une diminution de la production des acides nucléiques par rapport aux protéines alors que ceci n'est pas reflété dans les spectres IR. Cela peut provenir de la différence entre la surface sondée pour chaque technique. En effet, ces informations sont localisées dans le cas des spectres Raman et moyennées sur la surface du cristal pour les spectres IR.

Alors que pour les deux souches bactériennes, nous avons observé une augmentation de la production des polysaccharides, la production des acides nucléiques dans le cas d'*E. coli* semble être moindre à l'état sessile par rapport à l'état planctonique contrairement à ce que nous avons observé pour *P. fluorescens*.

#### 2.4. Etude *in situ* par SMFS des propriétés conformationnelles des EPS produites par un biofilm de 24 h d'*Escherichia coli* formé dans des conditions standard de croissance

Dans le cas d'*E. coli*, nous avons utilisé des sondes fonctionnalisées avec la WGA, spécifique du N-acétylglucosamine et de l'acide sialique. La souche utilisée surexprime le PNAG, on considère qu'on sonde spécifiquement ce polymère. Nous présentons par la suite l'analyse de 1024 courbes de force enregistrées sur une région de 20 x 20  $\mu\text{m}$ , ces résultats sont représentatifs de l'ensemble des données enregistrées. La région analysée est montrée dans la Figure IV.28.

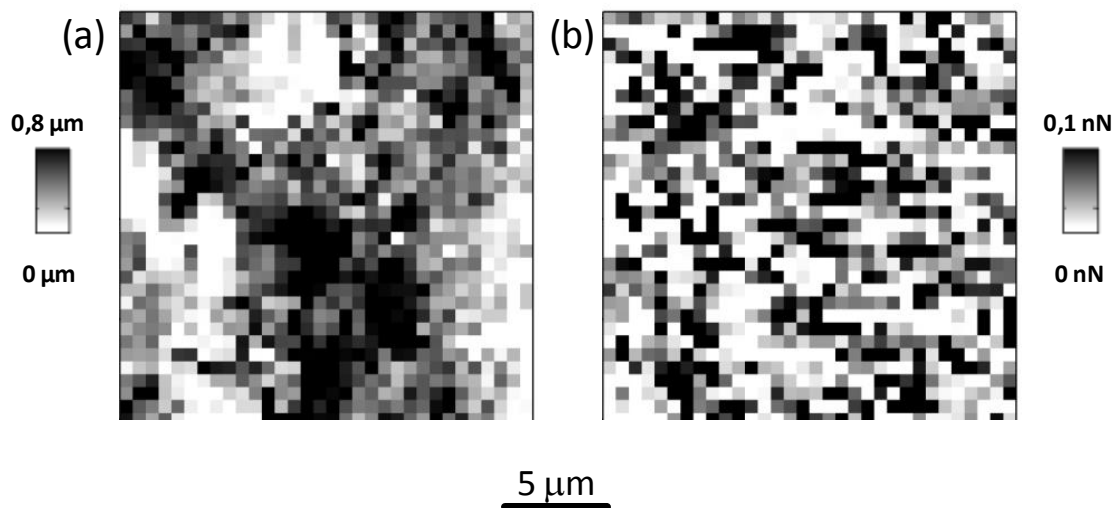


Figure IV.28 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20  $\mu\text{m}$  de la surface d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h

La Figure IV.29 montre des exemples représentatifs de courbes de force expérimentales obtenues sur la région présentée dans la Figure IV.28.

Les courbes de force montrent une grande variété avec la présence dans certains cas d'une succession de plateaux et de ruptures, et / ou des transitions sous forme d'escalier caractérisé par deux plateaux successifs (Figure IV.29.a). Les ruptures sont caractérisées par des forces relativement importantes pouvant atteindre jusqu'à 0,25 nN comme dans l'exemple montré dans la Figure IV.29.c, ce qui reflète une grande stabilité des polymères étirés. De même, les courbes montrent des elongations allant dans certains cas jusqu'à 6000 nm. Ce profil des courbes de force en palier est typique d'un réseau de polymères plus ou moins enchevêtré



[288, 306]. La succession de plateaux séparés par des ruptures reflète un réseau moyennement enchevêtré alors que les transitions en forme d'escaliers sont caractéristiques d'un réseau hautement enchevêtré [288].

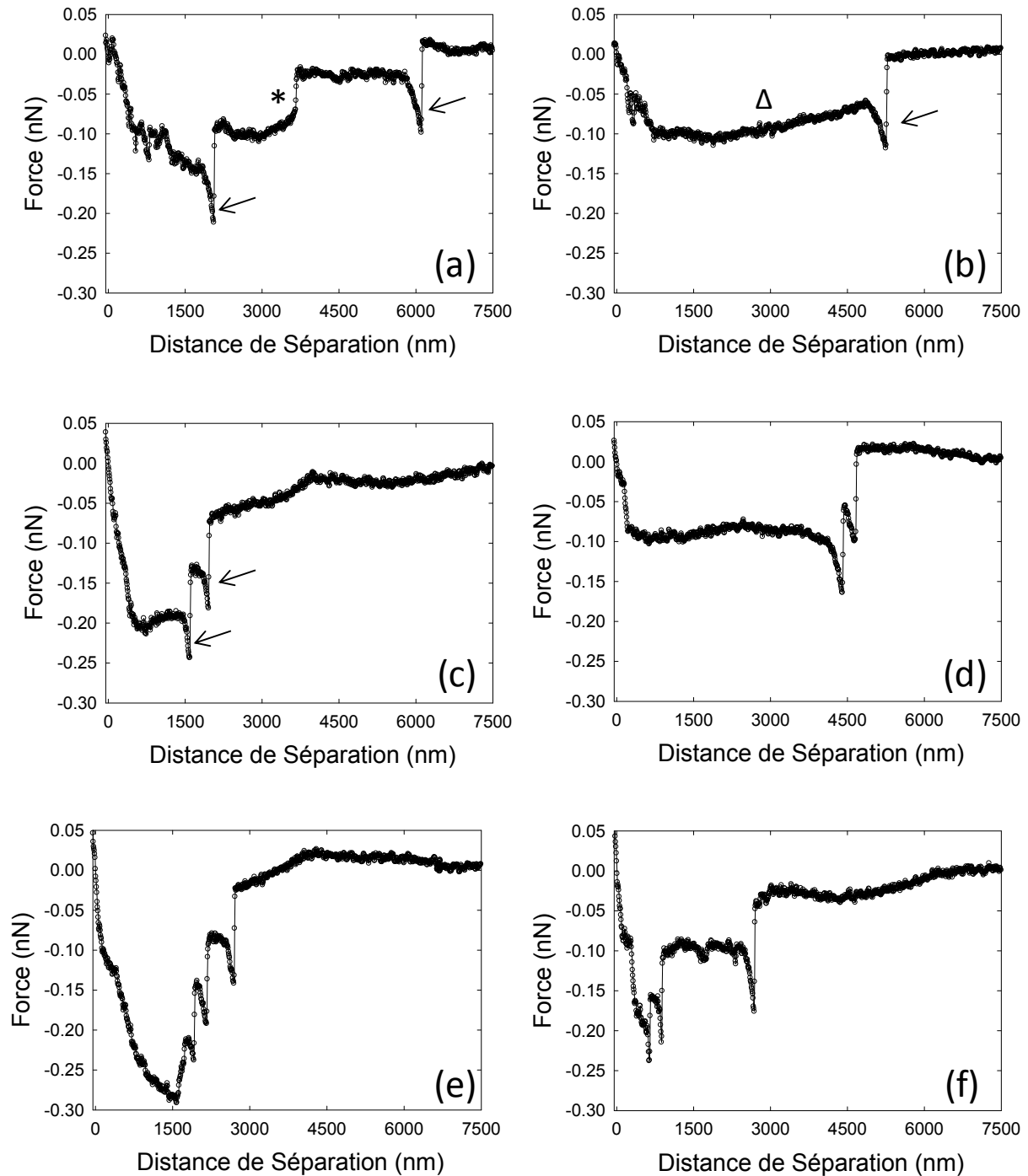


Figure IV.29 : Courbes de force-distance expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la WGA sur un biofilm d'*E. coli* de 24 h, chaque courbe de force-distance correspond à une région distincte d'un même échantillon, (\* : transition sous forme d'escalier,  $\Delta$  : plateau, les flèches indiquent des événements de rupture)

Les plateaux sont attribués selon la littérature au déroulement d'une structure donnée [307], c'est-à-dire la rupture successive d'une série de liaisons de même type. La force demeure constante parce que la rupture d'une seule liaison est enregistrée à chaque fois. Ce genre de plateaux a déjà été observé dans les courbes de force de la carraghénane [308], du xanthane [309, 310], et du curdlan [311], et a été attribué au déroulement des hélices double brin dans le cas de carraghénane et de xanthan et des hélices triple brin dans le cas du curdlan . Dans nos résultats, nous attribuons ces plateaux à un aspect similaire de liaisons intermoléculaires ou inter-chaînes avec déroulement de chaînes interconnectées, la Figure IV.30 montre un schéma explicatif. Un comportement comparable de polysaccharides de gels marins a été récemment rapporté [288].

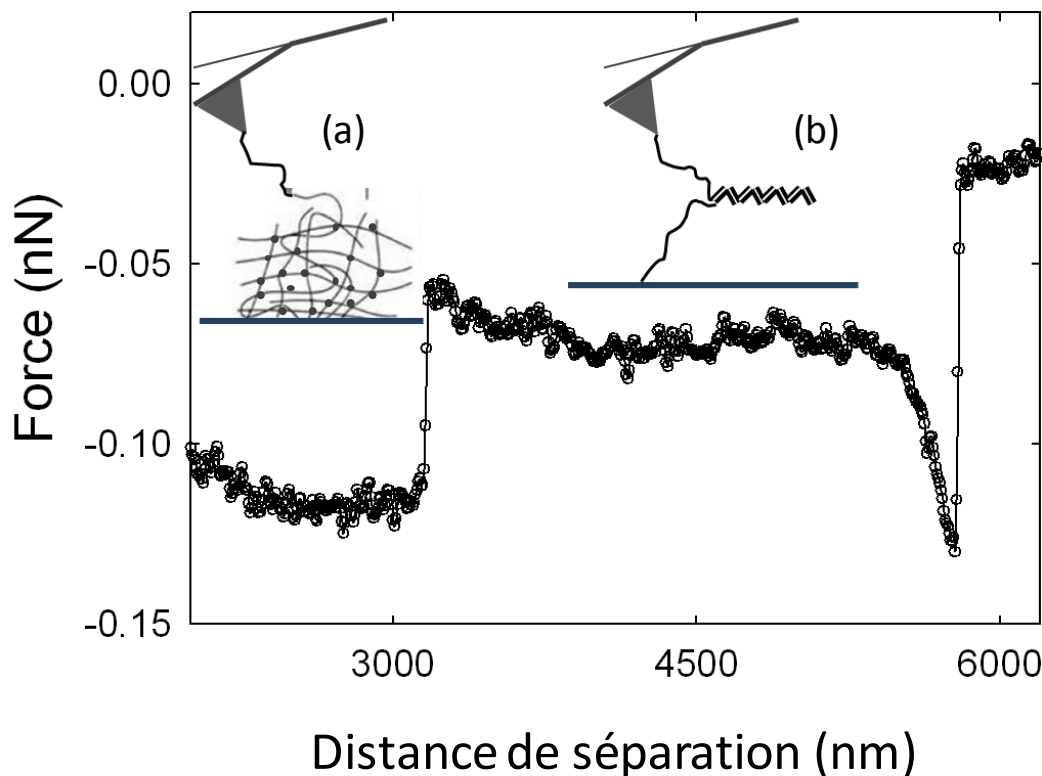


Figure IV.30 : Schéma explicatif de l'étirement d'un réseau de polymère (a) la transition sous forme d'un pas d'escalier correspond au déroulement des enchevêtrements de polysaccharides au sein du réseau, (b) les plateaux sont attribués au déroulement d'une structure des chaînes enchevêtrées par rupture successive d'une série de liaisons de même type

Par ailleurs, nous avons observé dans quelques cas la présence de plateaux successifs (sous forme d'escaliers) dont la transition ne passe pas par une augmentation de la force d'attraction

(Figure IV.29.a). Ceci a déjà été observé sur des gels de carboxyméthylcellulose [312] et de poly(N-isopropylacrylamide) [287] dans des conditions pauvres en solvant, ainsi que sur des gels de polysaccharides marins [288]. Ils ont été attribués au déroulement successif de fibres individuelles à partir d'un fagot de fibres entrelacées [312] ou d'une zone d'attraction [287]. Dans le cas de gels marins, ces plateaux en escaliers ont été attribués au détachement de fibres à partir de zones de jonction présentes dans le réseau de polymères [288]. Dans nos résultats, ce profil de courbes de force est toutefois rare, nous supposons alors que les transitions observées correspondent à l'étirement des polymères à partir des zones de jonction du réseau et donc au déroulement des enchevêtrements de polysaccharides (**Figure IV.30**). L'ensemble de ces interprétations suggère que le PNAG forme une matrice en forme de réseau hautement enchevêtré autour des cellules.

Les courbes de force ont été modélisées avec le modèle FJC spécifique aux polysaccharides. Toutefois, comme ce modèle est valable pour des EPS libres, c'est-à-dire non liés ou contraints dans un réseau, seules les longueurs maximales de contour ( $L_{max}$ ) et les forces d'adhésion reflètent les caractéristiques réelles des EPS du biofilm étudié. La **Figure IV.31** montre les distributions statistiques de ces paramètres.

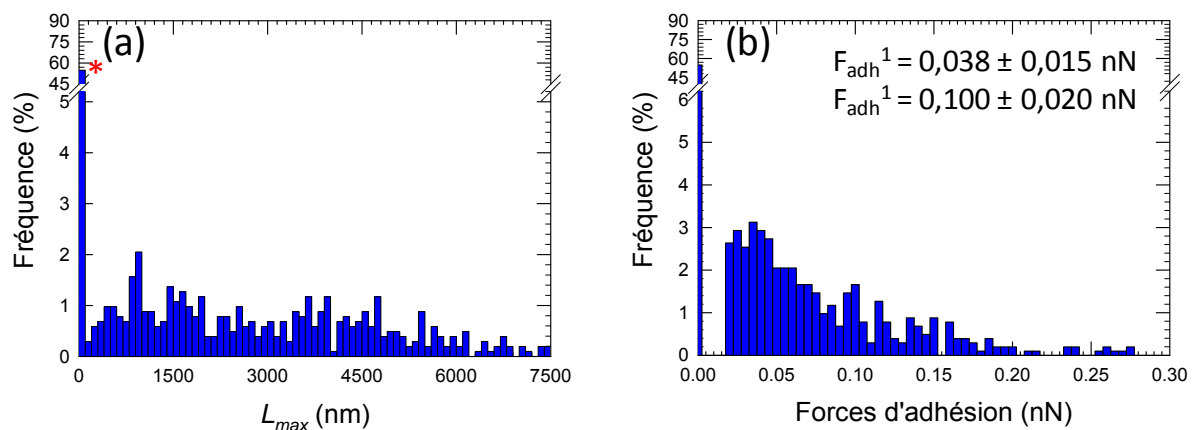


Figure IV.31 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en Poly N-acetyl glucosamine (PNAG) d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h obtenues par SMFS avec des sondes fonctionnalisés avec la WGA. Distributions statistiques des (a)  $L_{max}$  et des (b) Forces d'adhésion, \* : pourcentage à zéro = 46%

D'après La Figure IV.31, les EPS riches en N-acétylglucosamine ont été détectés uniquement sur 46% de la surface étudiée du biofilm. Cette valeur est calculée à partir de pourcentage des courbes de force qui ne présentent aucun évènement de rupture. D'après la Figure IV.31.a on

note des élongations allant de 100 jusqu'à 7000 nm, ceci reflète la production de polymères de différents poids moléculaires, ainsi que la complexité et l'hétérogénéité du réseau de PNAG. Les forces d'adhésion montrent une distribution bimodale avec les valeurs les plus fréquentes autour de 0,038 et 0,100 nN. La première valeur est voisine de celle rapportée pour une interaction unique entre une molécule de WGA et une molécule de N-acétylglucosamine de l'ordre de 0,047 nN [313]. Nous l'attribuons donc à l'interaction simple entre une lectine greffée à la surface de la sonde et un résidu de sucre d'un polymère à la surface du biofilm. La deuxième valeur est trois fois plus grande, elle reflète des interactions multiples entre la sonde AFM et les polymères de surface. Il faut préciser que la WGA possède plusieurs sites d'interaction avec le PNAG [226], de plus jusqu'à 5 molécules de WGA peuvent être greffées à l'apex de la sonde AFM selon le protocole utilisé [285]. Cette valeur peut donc aussi être attribuée au détachement simultané de trois molécules riches en N-acétylglucosamine de la sonde AFM. Ces molécules peuvent correspondre soit à trois molécules de PNAG soit à trois segments moléculaires (ramifications) d'une ou de plusieurs molécules.

En conclusion, les EPS produites par la souche d'*E. coli* étudiée forment un réseau hautement enchevêtré autour des cellules bactériennes. Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse pour expliquer certaines variations spectrales au cours de circulation du milieu LB/10, à savoir la diminution de l'intensité de certaines bandes et l'augmentation de signal des vibrations O-H. En effet, la formation d'un tel réseau autour des bactéries peut les éloigner de la surface du cristal diminuant ainsi le signal. Il est à préciser que ces résultats ne décrivent qu'une fraction d'EPS à savoir le PNAG. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser les exopolymères de la matrice extracellulaire. D'autant que les résultats IR et Raman ont montré une production importante de polysaccharides (intra et extracellulaires).

Ces résultats diffèrent de ce que nous avons obtenu dans le cas d'un biofilm de *P. fluorescens*, dans lequel les bactéries secrètent des exopolymères longs et ramifiés mais qui sont toutefois modélisables par les modèles décrivant des polymères simples. Ces différences témoignent l'importance de polysaccharides dans la structure de la matrice extracellulaire des biofilms ainsi que la particularité de chaque biofilm.



## **Chapitre V**

# **Influence d'un stress acide sur la formation des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli***



Nous avons caractérisé dans le chapitre IV le développement des biofilms de deux modèles bactériens : *P. fluorescens* et *E. coli* dans des conditions standard de croissance non stressantes. Ce chapitre sera dédié à l'étude d'une part du développement des biofilms sous un stress environnemental imposé à savoir une modification du pH, c'est-à-dire les changements métaboliques et biochimiques qui suivent son application et d'autre part à la caractérisation *in situ* de la composition chimique des biofilms de 24 h ainsi formés et de la conformation des EPS. Dans ce but, nous avons gardé les conditions opératoires utilisées pour la formation des biofilms décrits dans le chapitre IV et avons modifié le pH lors de la circulation du milieu LB stérile. Ainsi, après la circulation de la suspension bactérienne, le pH du milieu nutritif dilué qui assure le développement des biofilms était fixé à 3 et 5 pour le stress acide et à 9 pour le stress basique. Dans ce mémoire, seuls les résultats du stress acide (pH 3) seront présentés, l'exploitation et l'interprétation de l'ensemble des données n'étant pas totalement terminées.

## *1. Etude de la formation d'un jeune biofilm de *Pseudomonas fluorescens* dans un milieu acide*

---

### **1.1. Suivi *in situ* du développement d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* sous condition de stress acide**

La spectroscopie IR en mode ATR permet de suivre *in situ* et en temps réel le développement des biofilms en milieu acide en sondant les changements immédiats, de nature chimique liés à la protonation des groupements chimiques, et ceux « différés » résultants de l'effet du pH sur le métabolisme bactérien. La formation des biofilms a été initiée en suivant le même protocole utilisé pour la formation des biofilms de référence. Durant les trois heures de circulation de la suspension bactérienne  $S_{0-Pf}$ , les spectres IR ont été enregistrés pour vérifier l'état du biofilm. Ces spectres sont similaires à ceux obtenus précédemment au cours de cette étape. Par la suite, la suspension  $S_{0-Pf}$  a été remplacée par du milieu nutritif dilué (LB/50) dont le pH est fixé à 3.



### Effet immédiat de la diminution du pH

Afin d'étudier l'effet immédiat de la diminution du pH de 7 à 3, nous avons comparé le dernier spectre enregistré lors de la circulation de la suspension bactérienne (pH ~ 7) et le premier spectre enregistré suite à la circulation du milieu LB/50 de pH 7 ou 3 (Figure V.1). Les temps séparant l'enregistrement des deux spectres sont de 42 et 6 minutes respectivement pour le pH 7 et 3.

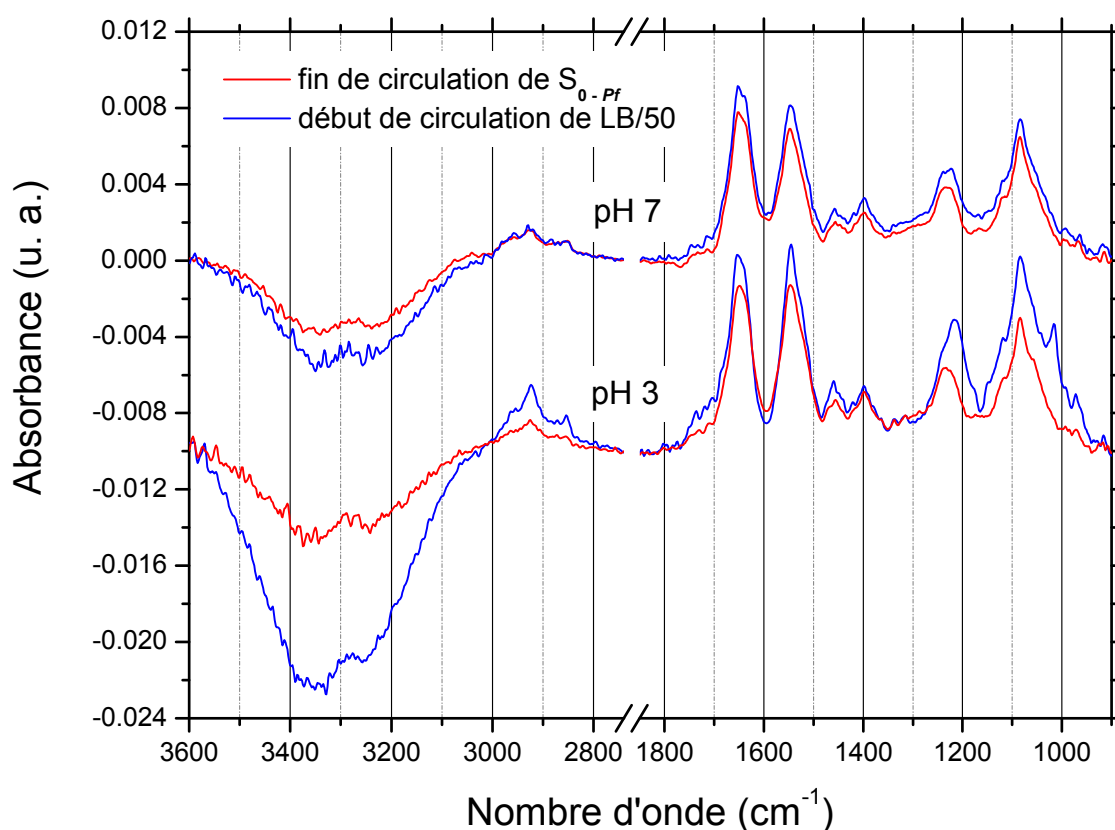


Figure V.1 : Spectres IR-ATR d'un très jeune biofilm de 3h de *P. fluorescens* enregistrés à la fin de circulation de la suspension  $S_{0-Pf}$  (trait rouge) et au début de circulation de LB/50 (trait bleu) au pH 7 (3h et 42 minutes) et 3 (3h et quelques minutes). Cristal ATR en germanium. Le spectre de référence est le premier spectre enregistré suite à la circulation de la suspension  $S_{0-Pf}$ .

D'après la Figure V.1, on remarque une évolution très différente des spectres selon le pH du milieu LB/50 en circulation. Pour le pH 7, l'ensemble de la signature est légèrement plus intense suite au développement du biofilm au cours de la période de 42 minutes séparant l'enregistrement des deux spectres. En revanche, quand on remplace la suspension

bactérienne par du LB/50 à pH 3, on observe une évolution du profil spectral nettement différente. On observe une forte diminution de l'intensité  $\nu$  OH ( $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ ), avec une augmentation de l'intensité de la plupart des bandes notamment celles associées aux élongations  $\text{CH}_2$  ( $2925$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$ ), à la déformation  $\text{CH}_2$  (vers  $1460\text{ cm}^{-1}$ ), aux élongations antisymétrique ( $1280-1190\text{ cm}^{-1}$ ) et symétrique (vers  $1084\text{ cm}^{-1}$ ) de  $\text{PO}_2^-$ , et aux polysaccharides ( $1150-950\text{ cm}^{-1}$ ), et de la bande à  $970\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition d'une bande vers  $1015\text{ cm}^{-1}$ . Comme l'intensité du signal IR dépend entre autres facteurs, de la proximité des bactéries du cristal ATR (cf. **chapitre II**), l'augmentation en intensité du spectre après quelques minutes de circulation de LB/50 à pH 3 ne peut être due qu'au rapprochement des bactéries de la surface du cristal.

Les variations spectrales très rapides, voire peut-être quasi immédiates, au changement de pH ne peuvent pas provenir d'une réponse bactérienne. Elles sont l'effet direct du pH sur certains groupements chimiques de surfaces bactériennes [85]. En effet, on observe sur les spectres une augmentation de l'intensité du massif de  $1750$  à  $1700\text{ cm}^{-1}$  associé aux vibrations d'élongation  $\text{C}=\text{O}$  des esters et des acides carboxyliques [245, 314] parallèlement à une diminution de l'intensité dans la région de  $1600$  à  $1580\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongation antisymétrique du groupement  $\text{COO}^-$  [314, 315]. L'intensité de la bande à  $1400\text{ cm}^{-1}$  associée avec les vibrations d'élongation symétrique du groupement  $\text{COO}^-$  [314] varie peu. Ces observations reflètent la protonation des groupements  $\text{COO}^-$  suite à la diminution du pH. En effet, le pH modifie la charge de la surface bactérienne en protonant certains groupements chimiques comme notamment les groupements  $\text{COO}^-$ , ce qui entraîne une diminution de la charge négative à la surface bactérienne et de ce fait une diminution des répulsions électrostatiques entre les EPS à la surface des bactéries ainsi qu'entre les bactéries et la surface de cristal. Suite à cette réduction des répulsions intra et intermoléculaires, les EPS peuvent donc davantage se replier et s'entasser à la surface [85, 86, 316], d'où le rapprochement des bactéries de la surface du cristal et l'augmentation de l'intensité de l'ensemble du spectre. Ce rapprochement provoque simultanément l'augmentation des bandes d'élongations  $\text{C}-\text{H}$  et la diminution de la bande d'élongations  $\text{O}-\text{H}$ . Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par McWhirter *et al.* qui ont observé le rapprochement de bactéries *P. aeruginosa* à la surface d'un cristal ATR de ZnSe dans des conditions acides [85, 86].

D'autre part, le changement du profil spectral dans la région de  $1300$  à  $900\text{ cm}^{-1}$  avec l'augmentation importante en intensité suggèrent que l'augmentation du signal est due

principalement aux EPS, cependant, on ne peut pas juger de leur nature précise plusieurs effets se combinant.

### **Développement du biofilm à pH 3**

L'évolution spectrale durant les 21h de la circulation du LB/50 à pH 3 est montrée dans la Figure V.2 comparée à celle lors de la circulation du LB/50 à pH 7.

Suite à la mise en circulation de LB/50 à pH 3, l'évolution spectrale est nettement différente de celle observée à pH 7. On observe notamment une poursuite de la diminution de l'intensité  $\nu$  OH ( $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ ), d'ailleurs, cette diminution est beaucoup plus importante que celle observée à pH 7 (Figure V.2), ceci est accompagnée par une poursuite de l'augmentation de l'intensité des bandes associées aux élongations CH<sub>2</sub> ( $2925$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$ ) et à la déformation CH<sub>2</sub> (vers  $1460\text{ cm}^{-1}$ ). A ce propos, on note que l'intensité des bandes des élongations CH<sub>2</sub> est de même ordre de grandeur que l'intensité du signal dans la région de  $1800$  à  $900\text{ cm}^{-1}$ , ce qui est tout à fait remarquable compte tenu de la faible épaisseur analysée à ces nombres d'onde, de plus le profil de ces bandes change, notamment la bande à  $2854\text{ cm}^{-1}$  qui est mieux définie qu'à pH 7. Cette bande étant particulièrement sensible à l'ordre conformationnel des lipides et à leur assemblage, les modifications observées pourraient indiquer une altération de l'organisation des chaînes lipidiques au sein des membranes bactériennes.

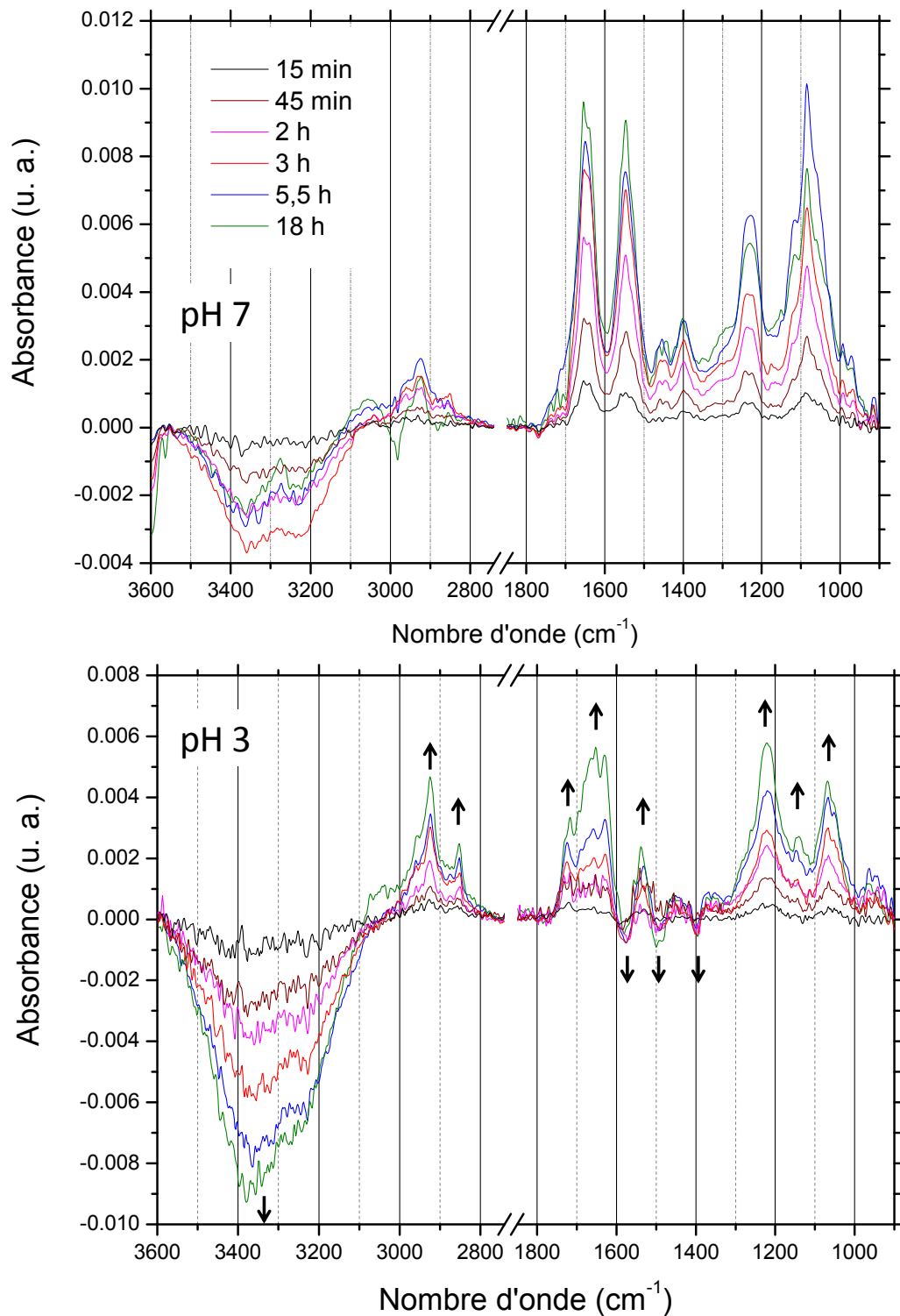


Figure V.2 : Spectres IR-ATR après 15, 45 min, 2, 3, 5,5 et 18 h de la circulation de LB/50 à pH 7 et 3. Cristal ATR en germanium. Les spectres ont comme référence le premier spectre enregistré suite à la circulation de LB/50

Les variations des spectres par rapport au pH dans la région entre 1800 et 900  $\text{cm}^{-1}$  sont présentées dans la Figure V.3.

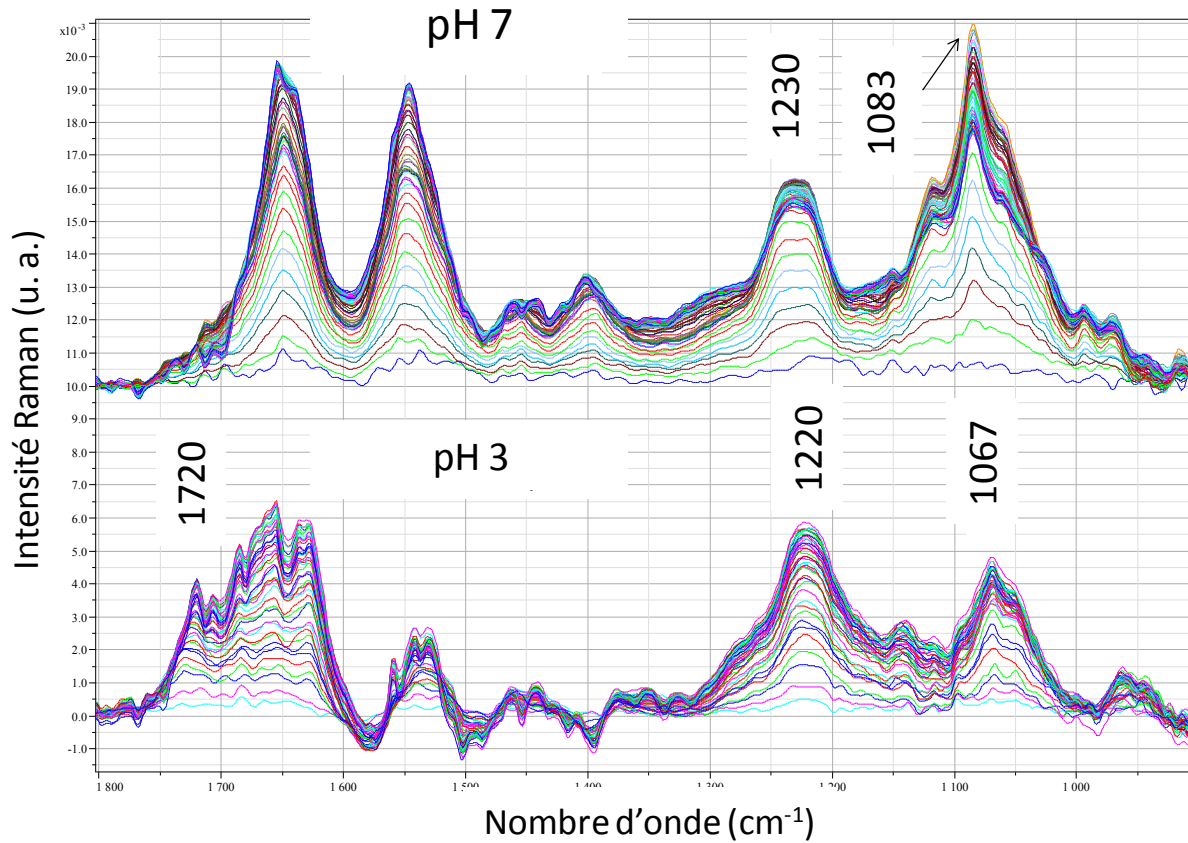


Figure V.3 : Comparaison de l'évolution des spectres IR-ATR d'un biofilm de *P. fluorescens* durant 21 h de circulation de LB/50 à pH 7 et 3. Cristal ATR en germanium

On remarque que l'intensité du massif vers 1720  $\text{cm}^{-1}$  continue à augmenter parallèlement avec la poursuite de diminution de l'intensité des bandes associées aux élongations antisymétrique et symétrique des  $\text{COO}^-$  vers 1580 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ . A ces deux bandes s'ajoute une qui apparaît en négatif vers 1490  $\text{cm}^{-1}$ , d'autres bandes associées aux  $\text{COO}^-$  peuvent éventuellement contribuer au signal dans la région de la bande amide II. En effet, on observe une diminution importante de l'intensité de cette bande par rapport à l'amide I, sachant qu'il y aura a priori une contribution négative de la bande de déformation OH vers 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Ce changement d'intensité et de profil des bandes amides I et II peut en partie être lié aux variations des bandes attribuées aux groupements  $\text{COO}^-$ , suite à leur protonation / déprotonation, se situant dans cette région, en particulier vers 1580  $\text{cm}^{-1}$ , et appartenant à un certain nombre d'acides aminés [317] et / ou de polysaccharides [315]. Ceci a déjà été

observé par Jiang *et al.* sur les spectres de suspensions des bactéries à Gram négatif [314]. On ne peut pas non plus exclure un effet éventuel du changement de la structure protéique. Ceci étant, les intensités des bandes amides I et II sont nettement plus basses dans les spectres du biofilm formé à pH 3 par rapport aux spectres à pH 7 et les profils assez différents. La bande amide A des protéines vers  $3288\text{ cm}^{-1}$  est également nettement moins marquée. Ces observations témoignent d'une synthèse protéique beaucoup plus faible à pH 3. Par ailleurs, l'augmentation progressive de l'intensité du massif à  $1720\text{ cm}^{-1}$  associé aux acides carboxyliques et esters nouvellement synthétisés et en parallèle la diminution de l'intensité des bandes associées aux groupements  $\text{COO}^-$  semble suggérer une protonation progressive des substances intracellulaires. Il est à noter que mises à part les bandes des ions carboxylates nous n'observons aucune autre bande négative indiquant par la même que la biomasse présente au début de la circulation du milieu LB demeure présente à la surface.

La bande associée à l'élongation antisymétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$  apparaît désormais plutôt autour de  $1220$  au lieu de  $1230\text{ cm}^{-1}$ . Comme la bande amide II évolue très peu, les variations observées pour cette bande reflètent essentiellement les groupements  $\text{PO}_2^-$  des acides nucléiques et des phospholipides. Cette bande est particulièrement sensible aux changements structuraux des  $\text{P=O}$  et  $\text{P-OH}$  des phospholipides [318, 319] et aux liaisons hydrogène [320, 321]. En revanche, dans le cas des acides nucléiques, elle est peu sensible au changement de pH (pH : 7 - 3) selon Tajmir-Riahi *et al.* [322]. Ce décalage peut être associé avec la protonation des groupements  $\text{PO}_2^-$  des phospholipides et aux variations des liaisons hydrogène. Or, il n'y a pas évolution au cours du temps, il ne semble pas que la bande précédemment à  $1230\text{ cm}^{-1}$  se retourne par exemple suite à la production des substances intracellulaires contenant des groupements  $\text{PO}_2^-$ . Cela signifierait que les nouvelles substances contenant des  $\text{PO}_2^-$  seraient protonées et donc en contact avec le milieu acide. Omoike *et al* [323] ont observé un décalage de cette bande aux nombres d'onde inférieurs dans les spectres des EPS extraites de *Bacillus subtilis* soumis à une variation de pH (de 9 à 2,6) qu'ils ont attribué à la complexation des protons par les groupements phosphate des EPS. On peut attribuer les variations de cette bande à un phénomène pareil impliquant la protonation des groupements  $\text{PO}_2^-$  des substances extracellulaires dont la nature est mal définie ou éventuellement des substances intracellulaires.

D'autre part, la bande à  $1085\text{ cm}^{-1}$  se retrouve plutôt à  $1067\text{ cm}^{-1}$ , celle à  $1151\text{ cm}^{-1}$  se retrouve à  $1143\text{ cm}^{-1}$  et est légèrement plus intense, de même l'épaule à  $1058\text{ cm}^{-1}$  est

décalé à  $1050\text{ cm}^{-1}$ . Le changement du profil de cette région spectrale peut être attribué aux variations des liaisons hydrogène intramoléculaires [314] sachant que la bande d'élongation symétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$  vers  $1080\text{ cm}^{-1}$  est moins sensible aux variations des liaisons hydrogène que celle d'élongation antisymétrique [321]. Un décalage de ces bandes aux nombres d'onde inférieurs à pH faible a été observé pour des EPS extraites de *Bacillus subtilis* pH (2,6 à 9) [323] et pour l'acide aminométhylphosphonic (pH de 2 à 7) [324]. Ce décalage a été attribué principalement à la diminution des liaisons hydrogène au niveau des groupements  $\text{PO}_2^-$  et à la dissociation des groupes O-H des acides carboxyliques et des polysaccharides en augmentant le pH [323]. D'autre part, l'absence de la bande à  $1085\text{ cm}^{-1}$  suggère une forte diminution de la production des acides nucléiques, comme l'élongation symétrique des groupements  $\text{PO}_2^-$  des acides nucléiques est très peu sensible à la variation du pH [322]. D'autre part, le rapport  $I_{1220} / I_{1067}$  est inversé ce qui reflète une contribution moindre des polysaccharides et donc une production faible de ceux-ci. Ces résultats suggèrent que les produits nouvellement formés sont en majorité de nature lipidique avec sans doute une part protéique mais des études complémentaires sont nécessaires pour en déterminer exactement la nature.

## **1.2. Caractérisation vibrationnelle (infrarouge et Raman) du biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé sous condition acide**

Les spectres IR ont montré des différences métaboliques importantes entre les biofilms formés à pH 7 et 3. De plus à 24 h, la structure membranaire et l'état d'organisation des lipides semblent être affectés par la diminution du pH. La région spectrale entre  $1300$  et  $900\text{ cm}^{-1}$  est perturbée par l'effet des liaisons hydrogène sur les vibrations des groupements phosphate, mais elle témoigne d'une production faible des polysaccharides et des acides nucléiques, de même la synthèse protéique est fortement diminuée par rapport au pH 7. A la fin de la circulation de LB/50, nous avons enregistré des images par microscopie à épifluorescence suite au test *BacLight*<sup>TM</sup> pour étudier l'intégrité membranaire. La Figure V.4 montre en particulier deux images.

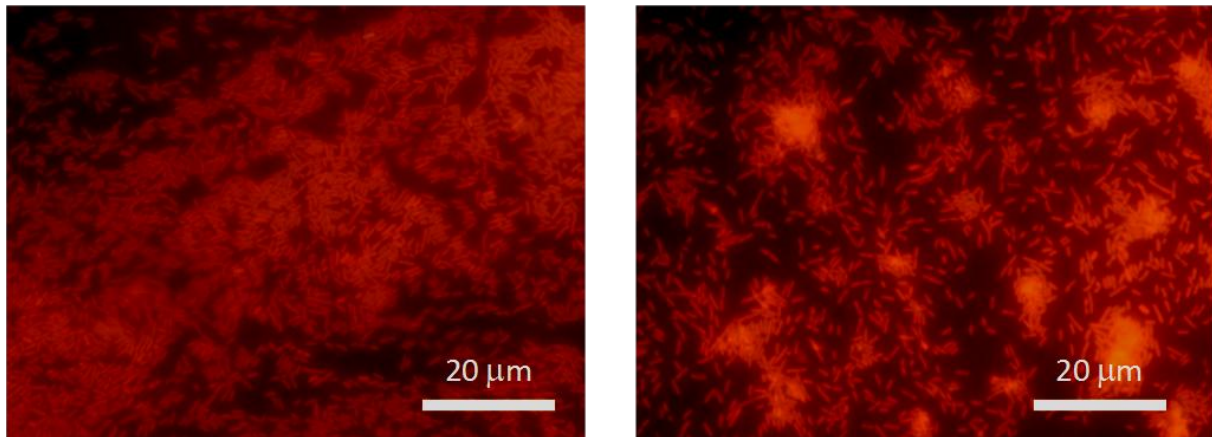


Figure V.4 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens*, formé sous condition de stress acide, suite au test *BacLight*<sup>TM</sup>, (mélange de Syto 9, fluorochrome vert des cellules intactes, et d'iodure de propidium, fluorochrome rouge des cellules à membranes endommagées), les images présentées sont enregistrées à deux endroits différents du cristal

Ces images montrent que le biofilm est constitué principalement d'une seule couche bactérienne avec la présence de certaines régions où les bactéries se regroupent en amas avec un taux de recouvrement de 33%. On remarque que les bactéries fluorescent en rouge, ce qui signifie que leur membranes plasmiques sont endommagées [325] alors qu'à pH 7, ce test montre que les bactéries possèdent des membranes intactes. Le milieu acide endommage les membranes bactériennes, ce qui peut expliquer en partie le changement du profil des elongations  $\text{CH}_2$ . D'autre part, cela peut favoriser l'échange des protons avec le milieu environnant et / ou éventuellement la fuite des composants intracellulaires et peut expliquer les observations spectrales témoignant une diminution progressive des bandes associées aux  $\text{COO}^-$  notamment celles à  $1580$  et  $1400 \text{ cm}^{-1}$  qui peut donc correspondre à la protonation des groupements  $\text{COO}^-$  intracellulaires ou alors à la fuite de composés contenant ces groupements. Ceci peut également expliquer en partie que la majorité des  $\text{PO}_2^-$  détectés seront protonés. Or, ces modifications spectrales sont observables dès 15 minutes de circulation de LB/50 à pH 3. En admettant un effet d'une perturbation de la structure membranaire, celle-ci se fait très rapidement, ou alors, il y a d'autres phénomènes mis en jeu. D'autre part, le taux de recouvrement (33 %) est comparable à celui calculé à la fin de circulation de la suspension bactérienne [117]. Donc, il semblerait que le milieu acide ralentit fortement ou inhibe la multiplication bactérienne au sein du biofilm d'où un taux de recouvrement faible. Ceci confirme qu'au cours de la période de la circulation de milieu LB on ne détecte plus la signature IR-ATR caractéristique des bactéries *P. fluorescens*. Les bactéries semblent



toutefois rester métaboliquement actives car les spectres IR évoluent tout au long des 21 de la circulation du milieu LB/50.

Le biofilm de 24 h a été étudié par MRC pour acquérir des informations supplémentaires sur sa composition chimique. Les spectres ont été enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm. La Figure V.5 montre deux exemples de spectres Raman obtenus sur deux zones d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé à pH 3 comparés à ceux d'un biofilm formé à pH 7.

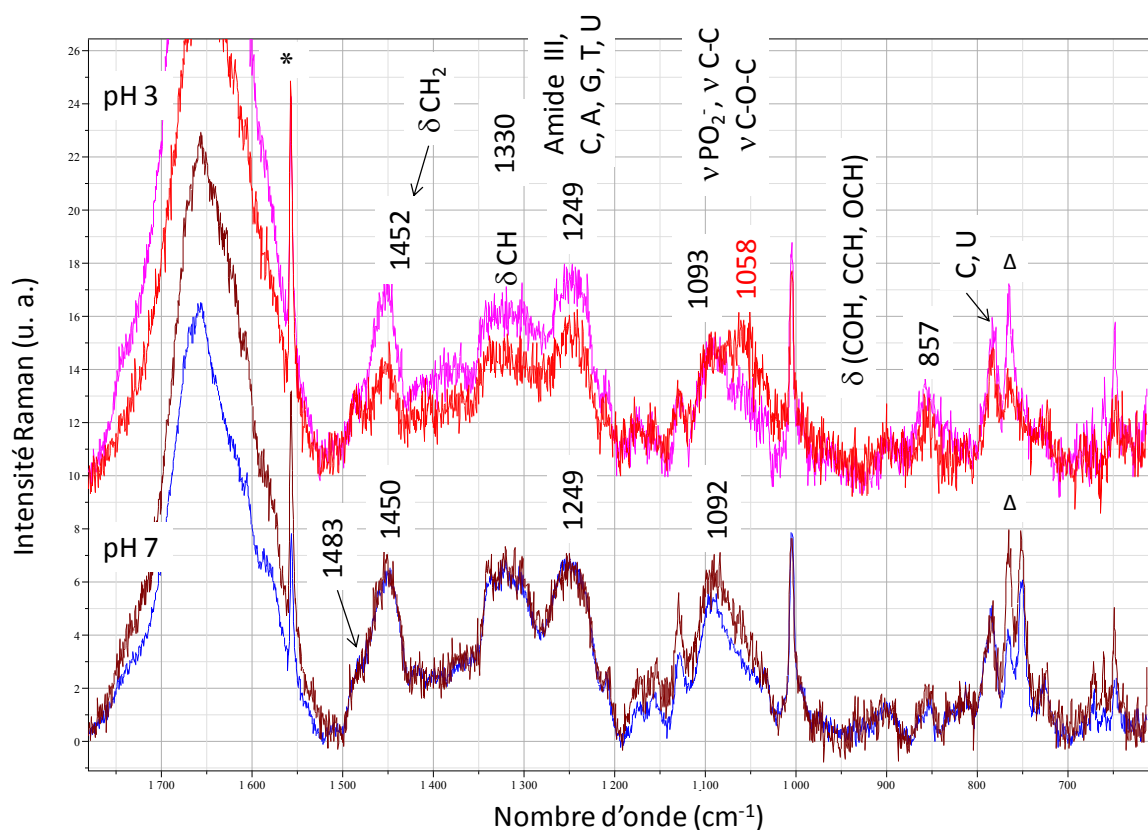


Figure V.5 : Spectres Raman d'un biofilm hydraté de *P. fluorescens* de 24 h formé dans un milieu LB/50 à pH 7 et 3. Longueur d'onde d'excitation : 530 nm. Les spectres correspondent à des régions différentes des biofilm et sont normés par rapport à la bande à  $1003\text{ cm}^{-1}$ , réseau à 1800 traits ( $\Delta$ , \* bandes attribuées au Ge et à  $\text{l'O}_2$  respectivement)

Le rapport signal / bruit est nettement mieux dans le cas des biofilms formés à pH 7, ceci peut être relié avec le taux de recouvrement faible à pH 3 et la présence de bactéries sous forme plutôt dispersée (Figure V.4). En outre, les spectres enregistrés à pH 3 et 7 présentent des différences importantes au niveau des intensités relatives des bandes selon l'endroit analysé. Ces variations sont plus importantes dans le cas du biofilm formé à pH 3, en particulier au niveau des bandes de déformation  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}$  respectivement vers  $1450$  et  $1330\text{ cm}^{-1}$ . D'autre

part, l'intensité de la bande amide III augmente, parallèlement avec un changement du profil de la bande centrée à  $1080\text{ cm}^{-1}$ , notamment par changement des intensités relatives des bandes vers  $1093$  et  $1058\text{ cm}^{-1}$ . Un changement du profil de cette dernière est également observé dans les spectres du biofilm formé à pH 7 mais à un moindre degré. Comme les spectres sont normés par rapport à la bande de la phénylalanine, les variations de la bande amide III proviennent principalement des acides nucléiques. La bande centrée à  $1080\text{ cm}^{-1}$  est composée de plusieurs bandes : celle à  $1095\text{ cm}^{-1}$  associée aux élongations C-C et C-O-C des polysaccharides et à l'élongation symétrique du groupement  $\text{PO}_2^-$ , et celle à  $1058\text{ cm}^{-1}$  est principalement attribuée aux polysaccharides. Ces variations reflètent une composition totale différente des substances sondées notamment des polysaccharides et des acides nucléiques. L'étude en MRC est localisée à l'échelle du micromètre, selon l'endroit analysé, la composition chimique peut être différente notamment en fonction de la nature des EPS produites, mais aussi du métabolisme bactérien. Les images à épifluorescence du biofilm de 24h formé à pH 3 ont montré que les membranes bactériennes sont endommagées, la libération des composants intracellulaires peut également contribuer à ces différences.

Par rapport aux spectres du biofilm formé à pH 7, on remarque une diminution de l'intensité du massif centré à  $1330\text{ cm}^{-1}$  par rapport aux protéines accompagnée d'un changement de son profil, avec la bande à  $1339\text{ cm}^{-1}$  moins définie que dans les spectres du biofilm formé à pH 7. Ce massif est attribué principalement aux déformations des CH des protéines et des polysaccharides, la diminution de son intensité relative par rapport aux protéines reflète une contribution moindre des polysaccharides par rapport au biofilm formé à pH 7. De même, le profil du massif centré à  $1080\text{ cm}^{-1}$  est différent de celui observé dans les spectres du biofilm à pH 7, avec diminution de l'intensité de la bande à  $1095\text{ cm}^{-1}$  reflétant une diminution de la contribution des acides nucléiques par rapport aux protéines, ce qui suggère une réduction de la synthèse des acides nucléiques.

Afin d'étudier la production éventuelle de polysaccharides, nous avons marqué le biofilm avec la ConA-TxR spécifique aux résidus glucose et mannose. La Figure V.6 montre deux exemples d'images enregistrés par microscopie à épifluorescence.

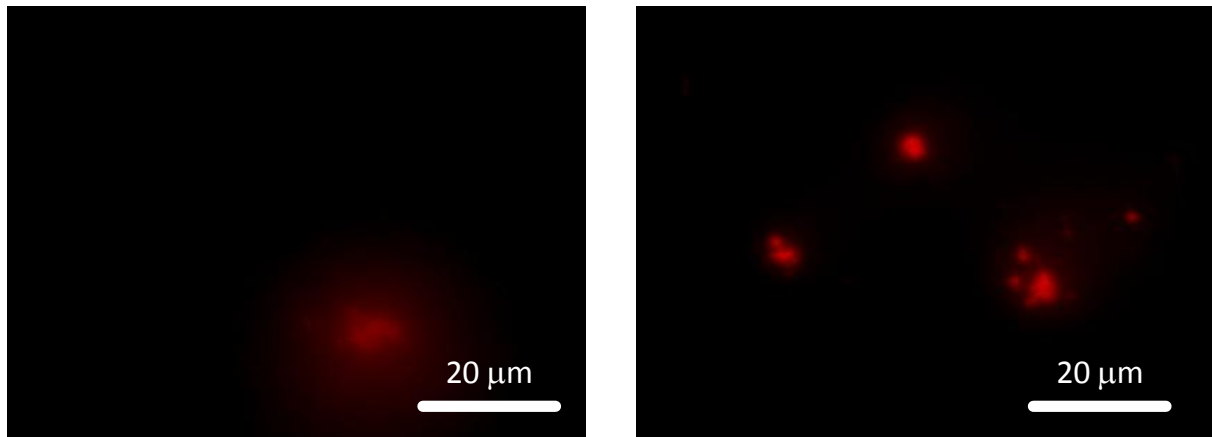


Figure V.6 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm de 24 h de *P. fluorescens*, marquage au ConA-TxR spécifique de résidus de glucose et de mannose, les images correspondent à deux endroits différents du cristal

La fluorescence rouge signifie la présence de résidus de glucose et / ou de mannose. Une telle fluorescence a été observée dans le cas du biofilm de référence et nous l'avons attribuée à la production de glycogène extracellulaire, sa signature ayant été décelée dans les spectres IR (**cf. chapitre IV**, Figure IV.6). Dans le cas présent, les spectres du biofilm formé à pH 3 ne montrent pas la signature IR du glycogène, ce qui reflète un taux de production faible ou éventuellement, la production d'un autre polysaccharide à base de glucose et / ou de mannose.

On remarque d'ailleurs que les spectres du biofilm formé à pH 3 ne montrent pas la bande associée au cytochrome *c* à  $750\text{ cm}^{-1}$ , contrairement au cas du biofilm formé à pH 7. Ce signal est sensible à l'état d'oxydation du cytochrome *c*, un signal plus faible peut être associé à une activité métabolique faible. Or, il est localisé au niveau des membranes bactériennes qui sont endommagées suite au stress acide, la dénaturation de la protéine peut favoriser l'oxydation de son groupement hème.

### **1.3. Etude par SMFS des propriétés conformationnelles des exopolymères d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* de 24 h formé à pH 3**

Les résultats discutés ci-après correspondent à une cartographie de 1024 courbes enregistrée sur une région de  $20 \times 20\ \mu\text{m}$  et sont représentatifs de l'ensemble des données enregistrées. La Figure V.7 montre les cartographies de hauteur et d'adhésion correspondantes.

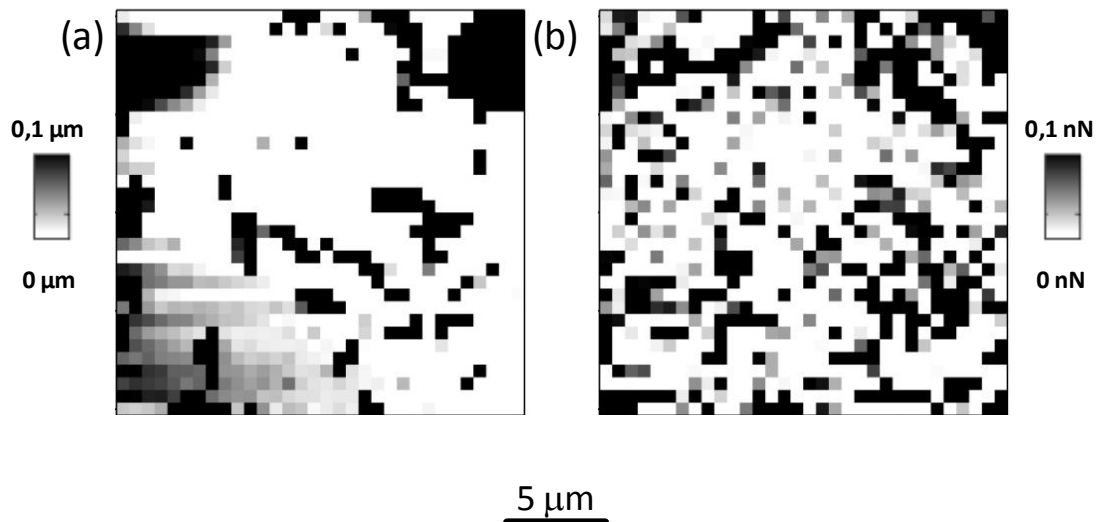


Figure V.7 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20 µm de la surface d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé à pH 3

On observe sur la cartographie de hauteur la présence des amas dispersés de bactéries à la surface. Les forces d'adhésion sont maximales essentiellement à leur entourage. La Figure V.8 présente des exemples représentatifs de courbes de force expérimentales obtenues sur un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé à pH 3. Comme dans le cas des biofilms formés dans des conditions de référence, nous avons utilisé des sondes fonctionnalisées avec la ConA, les mesures ont été faites ainsi dans une solution tamponnée à pH 4,7, optimum pour l'activité de la ConA.

Les courbes de force présentées dans la Figure V.8.a et c montrent des motifs en dents de scie comparables à ceux déjà observés sur les courbes de force obtenues sur le biofilm référence. Cependant ces motifs sont moins fréquents et moins nombreux. La signification de ces pics a déjà été discutée dans le chapitre IV. Ils sont en général attribués à des dépliements moléculaires séquentiels [150, 288, 289] ou à des détachements moléculaires successifs des macromolécules liées spécifiquement à la lectine ConA [289]. Ces courbes de force renferment jusqu'à 23 pics dans certains cas, caractérisés par des forces de l'ordre de 0,160 nN, et montrent des élongations pouvant arriver jusqu'à 3000 nm, donc les exopolymères détectées par la sonde et étirées sont particulièrement longs et ramifiés vu le nombre important de pics par courbe de force. D'autre part, certaines courbes de force montrent des élongations courtes en dessous de 1000 nm (Figure V.8.d-e) avec un nombre de pics inférieur à dix. Ces courbes de force correspondent probablement à l'extension d'exopolymères courts et moins ramifiés.

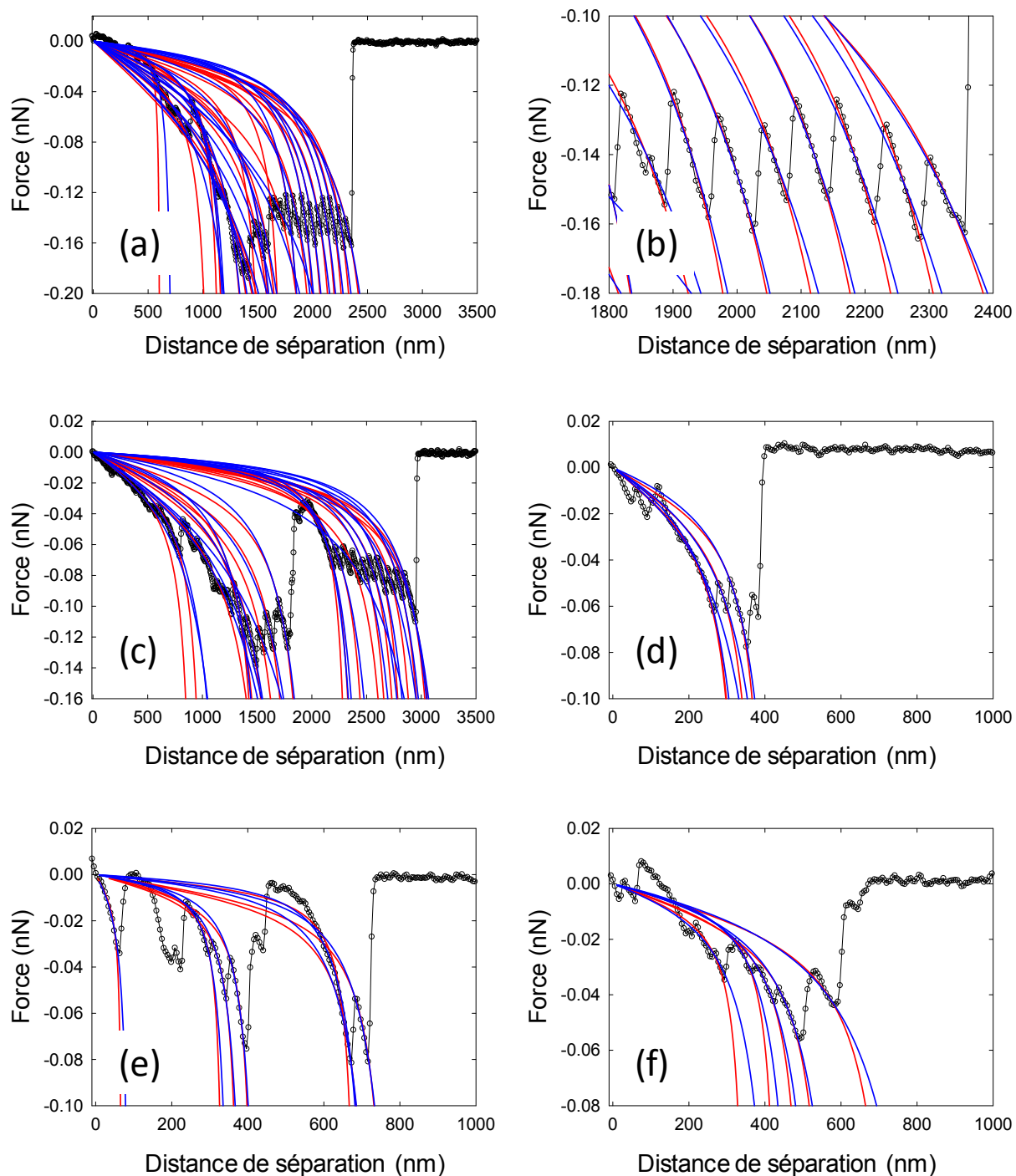


Figure V.8 : (a, c-f) Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la ConA sur un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé à pH 3, (b) agrandissement d'une région d'intérêt. Les courbes de force correspondent aux différentes régions d'un même biofilm. Les courbes rouges et bleues correspondent à l'ajustement de ces courbes respectivement selon les modèles théoriques FJC et WLC.

L'analyse subséquente de l'ensemble des données a été faite par les deux modèles théoriques FJC et WLC. Des exemples des ajustements théoriques selon les deux modèles sont présentés dans la Figure V.8, les deux modèles montrent un bon accord avec les données expérimentales. L'évaluation des ajustements théoriques se fait suivant le paramètre d'optimisation  $q_{min}$ , qui est d'autant plus faible que le modèle est plus adéquat pour la description des résultats expérimentaux. La Figure V.9 montre la distribution de ce paramètre selon les deux modèles.

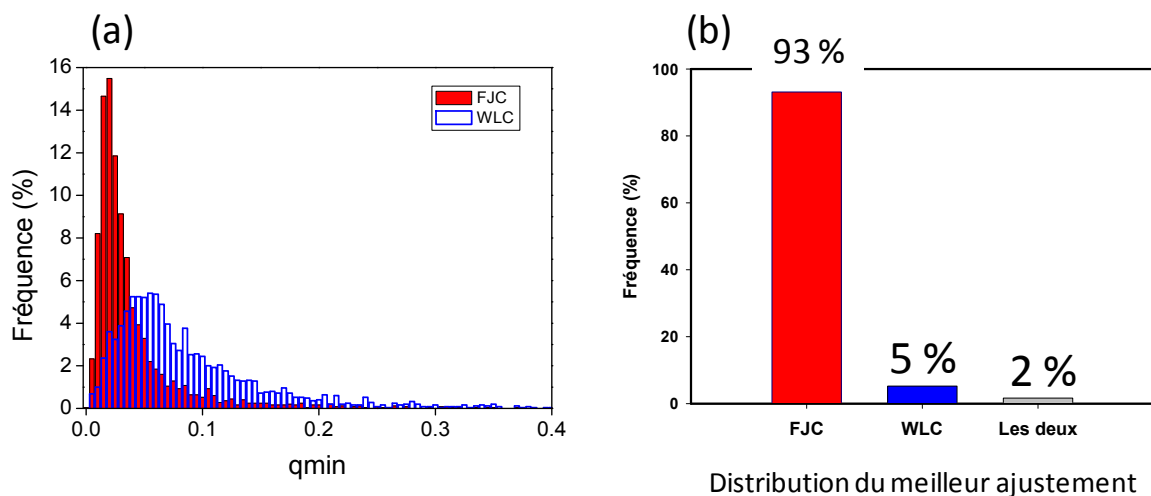


Figure V.9 : (a) Distribution des  $q_{min}$  calculés pour les modèles FJC et WLC, (b) distribution du meilleur ajustement par FJC et WLC. Les deux modèles sont considérés équivalents quand la différence de la qualité d'ajustement est inférieure à 5%.

Comme dans le cas du biofilm référence, l'ajustement est nettement meilleur avec le modèle FJC, et ceci dans 93 % des cas. La présence d'une faible fraction de segments protéiniques est révélée par le fait que le modèle WLC donne un meilleur ajustement dans 5% des cas. Les Figure V.10 et Figure V.11 montrent les distributions statistiques des paramètres calculés.

D'après la Figure V.10, 63 % des courbes de force ne présentent aucun évènement de rupture, par la suite, une interaction entre la sonde fonctionnalisée et les exopolymères n'a été établie que dans 37 % de cas. En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour le pH 7 (Figure IV.17), on remarque une production plus importante des EPS riches en glucose / mannose à pH 7 puisque la fréquence des interactions entre la sonde et l'échantillon est de l'ordre de 60 %. Par ailleurs, l'analyse statistique des courbes de force montre jusqu'à 20 ruptures par courbe de force (Figure V.10.a), les valeurs les plus fréquentes étant autour de 5 contre 11

dans le cas du biofilm formé à pH 7 (Figure IV.17.a) ce qui suggère que les exopolymères sont moins ramifiés à pH 3.

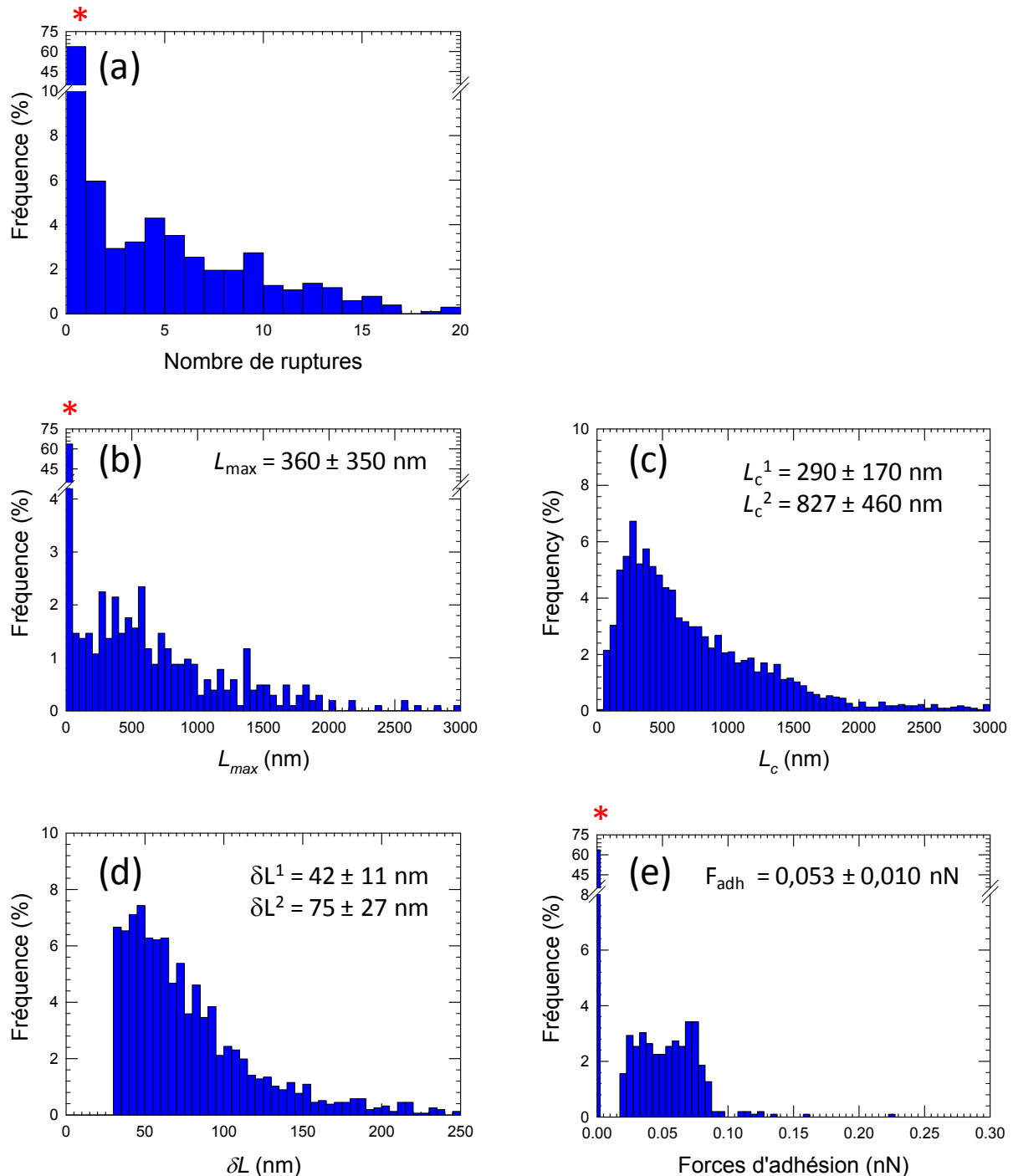


Figure V.10 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en glucose d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé en milieu LB/50 à pH 3. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA : (a) nombre de ruptures, (b)  $L_{max}$ , (c)  $L_c$ , (d)  $\delta L$ , (e) forces d'adhésion, \* : pourcentage à zéro = 63 %

D'autre part, les distances maximales de rupture,  $L_{\max}$ , présentent une distribution asymétrique centrée autour de 360 nm avec des valeurs plus élevées arrivant jusqu'à 1500 nm (Figure V.10.b) contre une distribution centrée à 720 nm dans le cas du biofilm formé à pH 7 (Figure IV.17.b). Cette valeur est proche de la valeur minimale des  $L_c$ , ceux-ci montrent une distribution asymétrique centrée à 290 et 830 nm. La proximité des  $L_{\max}$  et des  $L_c$  reflètent un taux de ramification faible de macromolécules. Ces distributions se distinguent de celles obtenues pour un biofilm formé à pH 7 (Figure IV.17.b, c) ou dans des conditions de pH non contrôlé [150]. Ces dernières montrent en effet un rapport  $L_{\max}/L_c$  supérieur à deux reflétant une structure ramifiée des exopolymères étirés. Ces résultats suggèrent que l'acidité du milieu aboutit au raccourcissement des exopolymères ainsi qu'à la diminution de leur taux de ramification.

Les valeurs du paramètre  $\delta L$  (Figure V.10.d) montrent une distribution largement asymétrique centrée autour de 42 et 75 nm, ceci suggère que les ramifications ne sont pas périodiques. Ces résultats se ressemblent à ceux observés pour le pH 7 (Figure IV.17.d) et à ceux obtenus dans des conditions de pH non contrôlé [150]. Cependant, nos résultats pour le pH 7 montrent une troisième distribution très large centrée vers 164 nm reflétant ainsi une hétérogénéité plus importante des distances de ramification et donc des exopolymères plus hétérogènes. Le rapport  $L_{\max}/\delta L$  reflète le taux de ramification, ce rapport est proche de 8 (360/42) contre 16 dans le cas du biofilm formé à pH 7. Ce rapport diminue par un facteur de 2, ce qui reflète également une diminution de taux de ramification.

D'autre part, les distributions des nombres de monomères (Figure V.11.a, b) sont larges et asymétriques, centrées à 855 et 2090 avec le modèle FJC et à 1800 et 4600 avec le modèle WLC. On note cependant des valeurs arrivant jusqu'à 20000 monomères contre 60000 au maximum dans le cas du biofilm formé à pH 7 (Figure IV.18.a, b). Cela témoigne d'une part d'une diminution de l'hétérogénéité des macromolécules étirées et d'autre part, du raccourcissement de ces dernières et / ou diminution de leur taux de ramification.



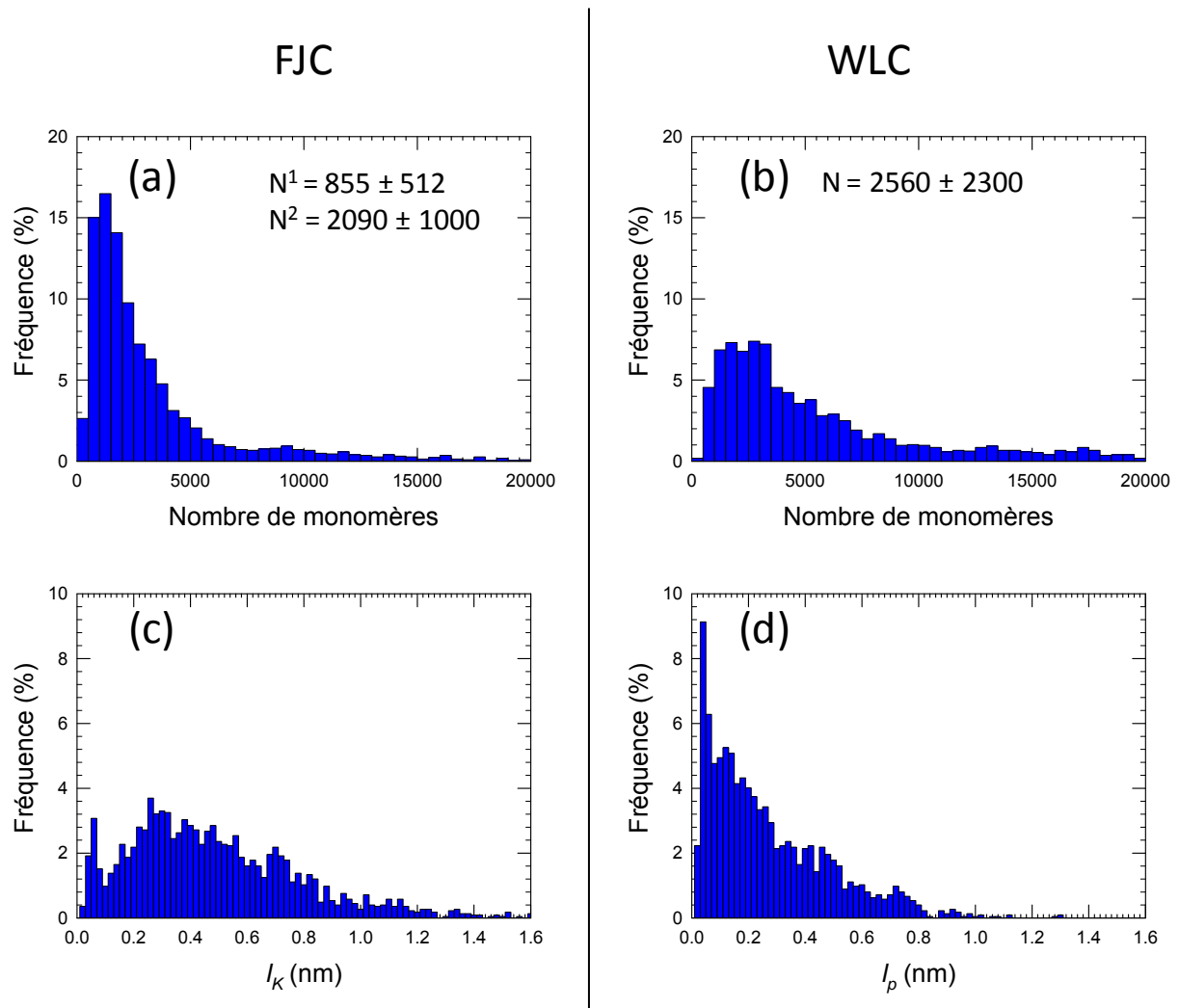


Figure V.11 : Nombre de monomères (a, b) et longueurs de Kuhn,  $l_k$  (c) et de persistance  $l_p$  (d) des macromolécules riches en glucose/mannose d'un biofilm de *P. fluorescens* de 24 h formé dans du LB/50 à pH 3. Les distributions statistiques sont obtenues à partir des données enregistrées par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la ConA, (a, c) modèle FJC, (b, d) modèle WLC

La Figure V.11.c montre une distribution large de  $l_k$  avec des valeurs arrivant jusqu'à 1,5 nm. La distribution présente un maximum à 0,056 nm, qu'on attribue à l'élongation d'un monomère de glucose suite au changement conformationnel de la position de la liaison C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, cette transition est de l'ordre de 0,06 nm [286]. Les valeurs supérieures à 0,15 correspondent à différentes transitions dans un polysaccharide. En effet, la longueur d'une liaison C-C est de l'ordre de 0,154 nm [286], celle d'un monomère de sucre est voisine de 0,24 nm [141, 200], les valeurs supérieures peuvent correspondre à des entités de deux à six monomères. Les valeurs de  $l_p$  (Figure V.11.d) présentent une distribution large et asymétrique avec un

maximum à 0,05 nm et des valeurs pouvant atteindre jusqu'à 1 nm. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre IV, la première valeur peut être attribuée aux faibles déformations des tours à l'intérieur d'une structure hélicoïdale [293, 294]. Les valeurs supérieures à 0,15 nm peuvent être attribuées à un pas typique des hélices  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi qu'à la taille d'un acide aminé qui est de l'ordre de 0,15 à 1,2 nm [295-297]. Comparé aux résultats obtenus dans le cas des biofilms formés à pH 7 (Figure IV.18.c, d) et aux travaux précédents sur des bactéries planctoniques [141] et sessiles [150], ces valeurs sont plus élevées, ce qui suggère que les exopolymères des biofilms formés à pH 3 sont plus rigides que ceux des biofilms formés à pH 7. Cette rigidification peut être liée à une conformation plus compacte des exopolymères suite à la diminution des répulsions intramoléculaires. Des valeurs de  $l_k$  comparables sont rapportées pour des polysaccharides des biofilms environnementaux par Abe *et al* [326].

Les forces d'adhésion montrent une distribution asymétrique centrée à 0,053 nN. Cette valeur correspond à une interaction simple entre une molécule de ConA à la surface de la sonde et un résidu de glucose à l'extrémité d'une chaîne d'EPS [285]. Le fait d'avoir majoritairement une interaction simple suggère que les EPS surviennent séparément à la surface de l'échantillon, ainsi la sonde AFM interagit majoritairement avec un seul exopolymère à chaque cycle de rapproche / retrait, ce qui reflète un taux de production faible.

Quant aux propriétés conformationnelles des EPS produites, on peut conclure qu'à pH 3, les exopolymères sont en moyenne plus courts et moins ramifiés que ceux produits à pH 7. De même, ces exopolymères sont légèrement plus rigides.

## 2. Effet d'un stress acide sur la formation d'un jeune biofilm d'*Escherichia coli*

---

### 2.1. Suivi *in situ* et en temps réel par FTIR-ATR du développement d'un biofilm d'*Escherichia coli* en milieu LB/10 acide pH 3

Le biofilm a été formé dans les mêmes conditions expérimentales adoptées lors de la formation du biofilm de référence. La première étape permet d'assurer l'adhésion bactérienne à la surface du cristal Ge à partir d'une suspension bactérienne  $S_{0-Ec}$  en mode statique pendant une demi-heure et en circulation à travers la cellule ATR pendant deux heures. Les spectres IR durant cette période sont similaires à ceux obtenus dans le cas du biofilm de référence.

A la fin de la circulation de la suspension bactérienne, elle est remplacée par du milieu LB/10 à pH 3.

#### **Effet immédiat de la diminution du pH**

La Figure V.12 montre les spectres enregistrés respectivement à la fin de la circulation de cette suspension et après le changement en milieu LB/10 à pH 3 comparés à ceux du pH 7. Le temps séparant les deux mesures est de 8 et 7 minutes respectivement pour le pH 3 et 7.

On observe que lors du changement de la suspension bactérienne par du milieu LB/10 à pH 7, l'intensité du spectre diminue globalement, mais le profil spectral reste quasiment le même. Cette diminution peut provenir d'un détachement des bactéries au moment du changement du milieu, ce qui entraîne une diminution de la biomasse à la surface du cristal et donc de l'intensité du signal. En revanche, quand on fait circuler du LB/10 à pH 3, on remarque que le profil spectral change à un grand degré.

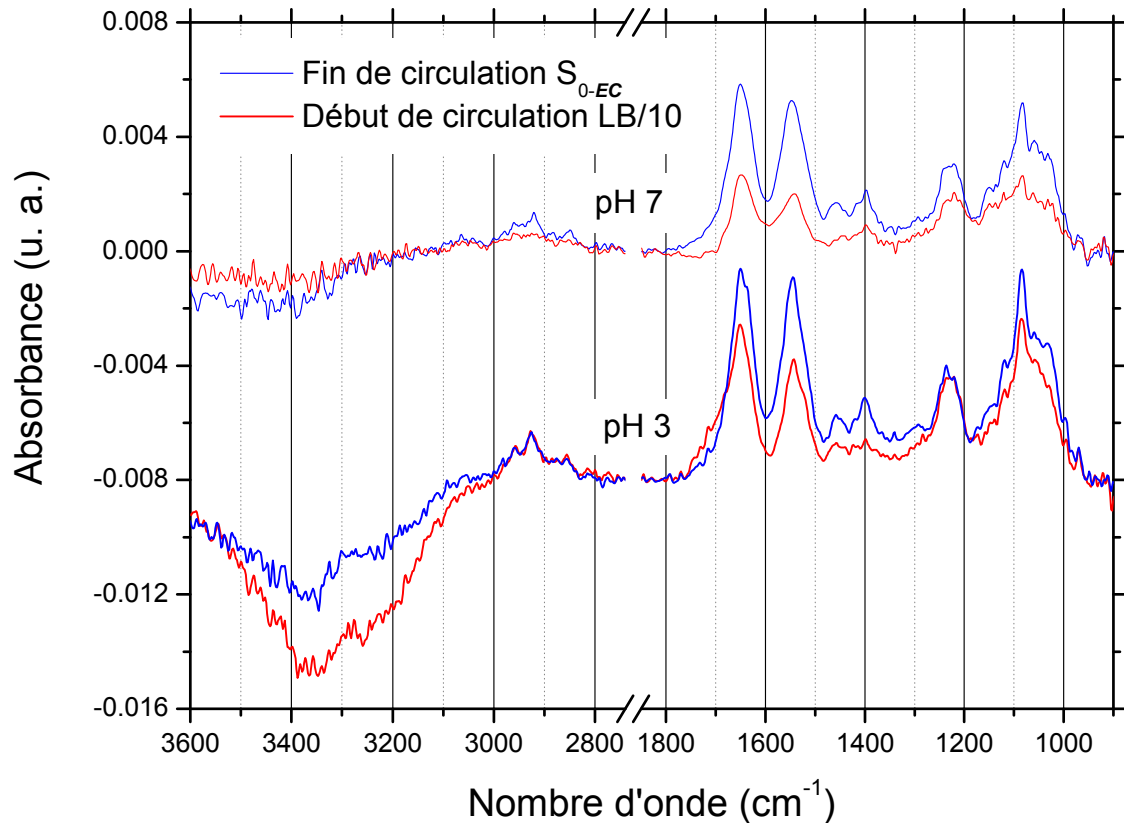


Figure V.12 : Spectres IR-ATR d'un très jeune biofilm de 3h d'*E. coli* enregistrés à la fin de circulation de  $S_{0-EC}$  (trait bleu) et au début de la circulation de LB/10 (trait rouge) au pH 7 et 3. Le spectre de référence est le premier spectre enregistré suite à la circulation de  $S_{0-Pf}$ . Cristal ATR en germanium

D'une part, l'intensité du massif vers  $3400\text{ cm}^{-1}$  de l'élongation des OH diminue. Cette bande est principalement attribuée aux vibrations de l'eau donc sa diminution reflète généralement une augmentation de la biomasse à la surface du cristal. Or, l'intensité du spectre n'augmente pas globalement. D'autre part, l'intensité des élongations des groupements  $\text{CH}_2$  est égale à celle observée dans le spectre enregistré à la fin de circulation de la suspension bactérienne, contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de *P. fluorescens* où ces bandes sont nettement plus intenses à pH 3, ce qui suggère que les bactéries ne se rapprochent pas de la surface du cristal suite à la diminution du pH.

Or, à part l'intensité des élongations  $\text{CH}_2$  et de la bande à  $1230\text{ cm}^{-1}$  qui restent constante, l'intensité du spectre diminue. Si les bactéries ne se rapprochent pas de la surface, on s'attendrait à ce que l'intensité de la bande des élongations  $\text{CH}_2$  et de la bande à  $1230\text{ cm}^{-1}$  diminue aussi. Une explication possible est qu'au moment du changement du milieu, des bactéries se décrochent de la surface ce qui diminue l'intensité globalement, d'autre part,

l'effet du pH peut amener comme dans le cas de *P. fluorescens* au rapprochement des bactéries de la surface. Les effets combinés de ces deux phénomènes peuvent expliquer la diminution de l'intensité du spectre simultanément avec une intensité quasi constante des bandes des élongations CH<sub>2</sub> et de la bande à 1230 cm<sup>-1</sup>.

On observe par ailleurs l'augmentation de l'intensité du massif autour de 1720 cm<sup>-1</sup> parallèlement avec une forte atténuation de la bande à 1400 cm<sup>-1</sup>. Ces bandes correspondent respectivement aux vibrations d'élongation C=O des esters et des acides carboxyliques et des élongations symétrique du groupement COO<sup>-</sup>. Leur évolution opposée reflète la protonation des groupements COO<sup>-</sup>.

La bande amide A des protéines vers 3280 cm<sup>-1</sup> devient également plus marquée, alors que les bandes amides I et II diminuent en intensité, et l'intensité de la bande amide II diminue par rapport à celle de l'amide I. On observe également une légère diminution de la largeur à mi-hauteur de cette dernière en particulier du côté des hauts nombres d'onde. Ces observations sont en accord avec ceux de Jiang *et al.* [314] discutées ci-avant, et peuvent être attribuées notamment aux variations des intensités des bandes des groupements COO<sup>-</sup> dans cette région et / ou à une variation de la structure protéique.

On observe un changement du profil de la bande à 1230 cm<sup>-1</sup>, avec l'augmentation de l'intensité vers 1220 cm<sup>-1</sup> et l'apparition d'un épaulement à 1208 cm<sup>-1</sup>. Ce massif est principalement associé avec la vibration amide III des protéines et la vibration d'élongation antisymétrique du groupement PO<sub>2</sub><sup>-</sup> des acides nucléiques et des phospholipides. La protonation des groupements phosphate au niveau membranaire peut éventuellement expliquer ces variations spectrales. Jiang *et al.* [314] ont observé une bande à 1210 cm<sup>-1</sup> dans les spectres des suspensions bactériennes à pH <4. Ils l'ont attribué aux vibrations du groupement PO<sub>2</sub><sup>-</sup> des acides nucléiques et / ou aux groupements polyphosphate protonés. D'autre part, le massif vers 1080 cm<sup>-1</sup> est moins intense et légèrement décalé par rapport au spectre enregistré à la fin de circulation de la suspension bactérienne, se trouvant à 1085 au lieu de 1084 cm<sup>-1</sup>. Le profil de ce massif change légèrement, notamment l'épaulement vers 1057 cm<sup>-1</sup> est relativement plus intense, celui à 1028 cm<sup>-1</sup> diminue légèrement. Ce massif est associé principalement avec les polysaccharides et la vibration d'élongation symétrique des PO<sub>2</sub><sup>-</sup> des acides nucléiques et des phospholipides. Cependant, en supposant que l'effet de la diminution du pH ne sera pas immédiat sur les acides nucléiques, on peut supposer que ces

variations sont reliées principalement aux phospholipides et aux polysaccharides. Selon Jiang *et al.* [314], les variations dans cette région spectrale peuvent être associées avec des variations des liaisons hydrogène suite à la protonation des groupements  $\text{COO}^-$  et  $\text{PO}_2^-$ .

L'ensemble de ces observations met en évidence la protonation de certains groupements chimiques, notamment des  $\text{COO}^-$  et  $\text{PO}_2^-$ , entraînant ainsi une modification de la charge de la surface bactérienne et par la même une réorganisation par rapport à la surface du cristal, des bactéries et des EPS ainsi que très probablement un changement de conformation de ces derniers.

### **Développement du biofilm à pH 3**

La Figure V.13 montre l'évolution spectrale au cours des 21,5 h de circulation du milieu LB/10 à pH 3.

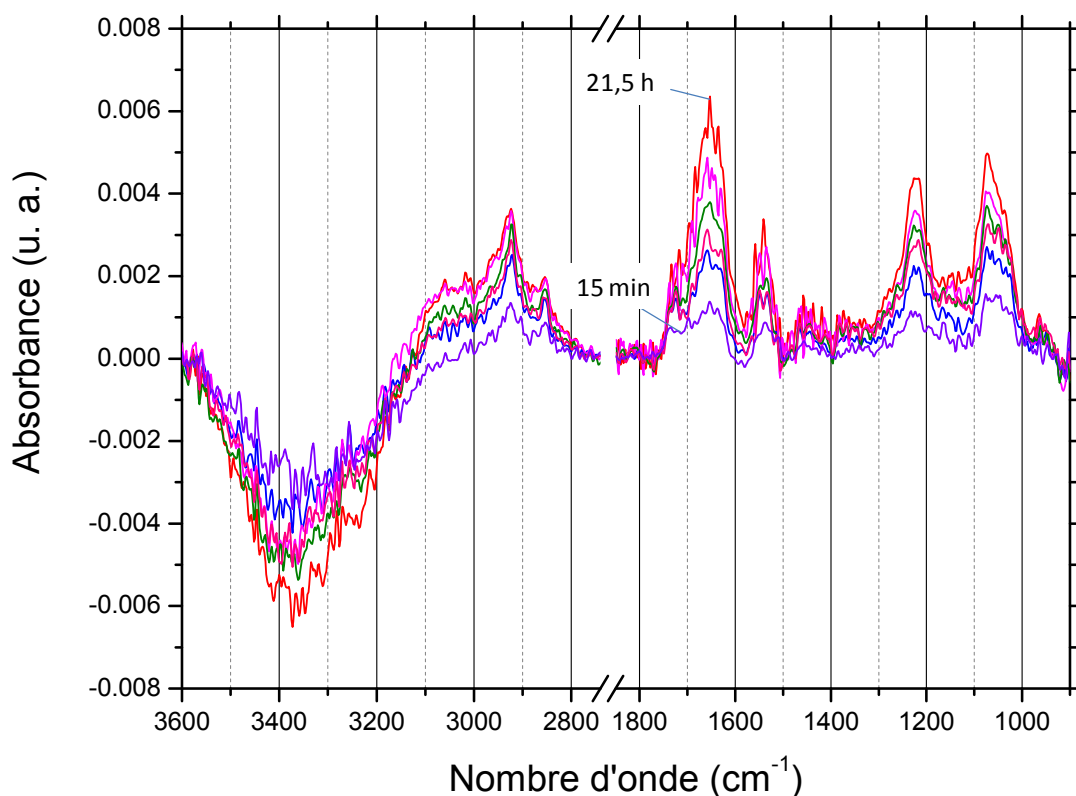


Figure V.13 : Spectres IR-ATR après 15 min, 2, 3, 8, 12 et 21,5 h de la circulation de LB/10 à pH 3. Les spectres ont comme référence le premier spectre enregistré au début de la circulation de LB/10. Cristal ATR en germanium

On constate que l'évolution spectrale suite à la circulation du LB/10 à pH 3 est complètement différente de celle observée sous circulation du milieu LB/10 à pH 7 (Figure IV.23), où

l'évolution spectrale était caractéristique de la signature bactérienne. La Figure V.14 compare les signatures obtenues à la fin de la circulation de la suspension bactérienne avec celles reflétant l'évolution spectrale au cours de circulation de milieu LB/10 à pH 7 et 3. Or, à part la bande de l'élongation du groupement O-H dont l'intensité diminue au cours de la circulation de LB, l'intensité des principales bandes IR augmente, mais la signature ne se modifie pas significativement au cours du temps. D'autre part, on n'observe pas des pics négatifs donc les composés présents au début de la circulation du milieu LB/10 demeurent. Donc, on peut supposer que le métabolisme établi suite à la diminution du pH est mis en place très rapidement et demeure au cours des 21 h.

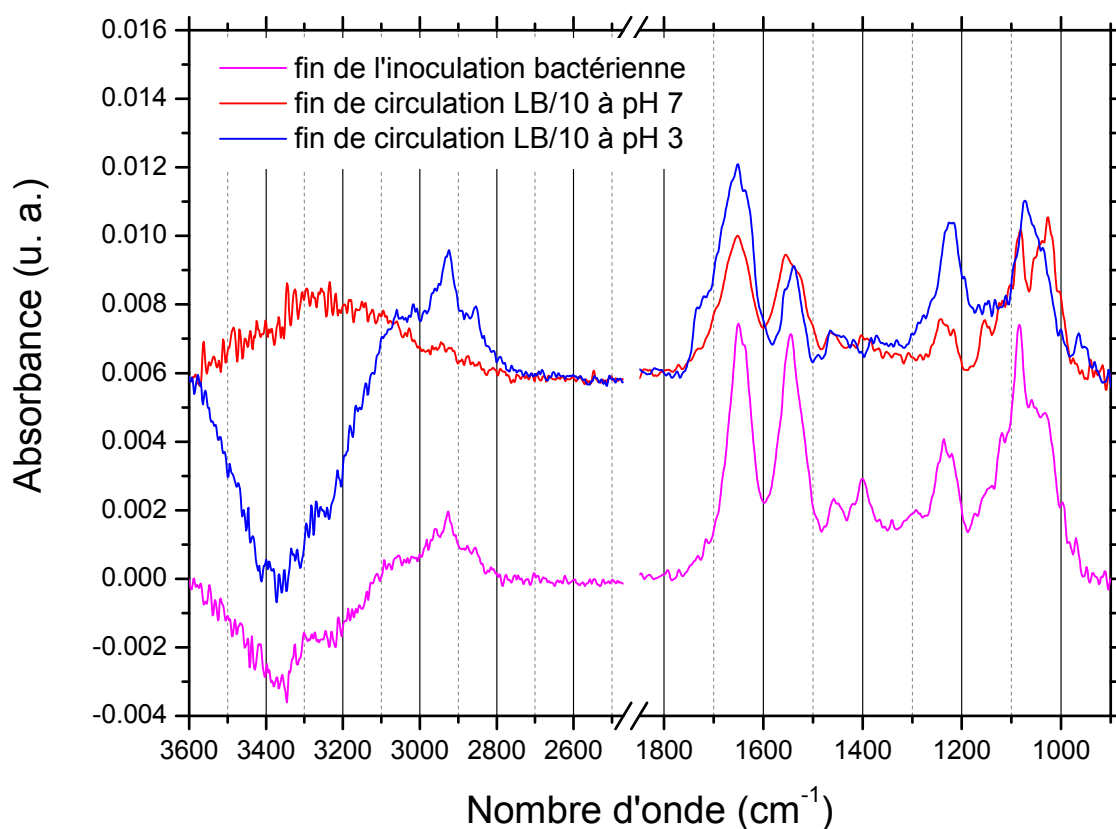


Figure V.14 : spectres IR-ATR de jeunes biofilms d'*E. coli* de 24h formés sous circulation du milieu LB/10 à pH 7 et 3 comparés au spectre à la fin des 3h d'inoculation bactérienne. Cristal ATR en germanium. Le spectre pris comme référence pour les deux spectres à la fin de la circulation de LB/10 est celui enregistré au début de cette circulation.

En particulier, on observe un décalage de la bande de l'élongation du groupement O-H par rapport au début de la circulation du LB/10 (Figure V.13), ce décalage peut être associé aux

variations dans les liaisons hydrogène associée à la protonation de certains groupements chimiques. En effet, on observe une nette augmentation de l'intensité du massif de 1750 à 1700  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongation du groupement C=O des esters et des acides carboxyliques, parallèlement avec une forte atténuation des vibrations d'élongation antisymétrique et symétrique du groupement  $\text{COO}^-$  respectivement à 1590 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Ces variations reflètent une protonation quasiment complète des groupements  $\text{COO}^-$ . En revanche, contrairement à ce que nous avons observé dans le cas de *P. fluorescens* (Figure V.2), ces deux dernières ne diminuent pas progressivement au cours de la circulation du LB/10. On peut supposer que les sites protonables sont immédiatement protonés ainsi que ceux des composés nouvellement produits. En outre, et comme dans le cas de *P. fluorescens*, les vibrations d'élongation  $\text{CH}_2$  sont particulièrement intenses, du même ordre de grandeur que le signal de 1800 à 900  $\text{cm}^{-1}$ . Ce signal est caractéristique des lipides avec deux bandes à 2923 et 2854  $\text{cm}^{-1}$  respectivement.

Alors que l'élongation du groupement O-H est très négative, le rapport amide I / amide II augmente fortement. Le changement du rapport de ces deux bandes en fonction du pH peut être associé avec des variations dans les bandes de vibration de l'élongation antisymétrique du groupement  $\text{COO}^-$  notamment de certains acides aminés (acide aspartique et glutamique), ou alors à un changement de la structure protéique [314]. La diminution simultanée de la bande à 1400  $\text{cm}^{-1}$  est en accord avec la première hypothèse.

Comme dans le cas de *P. fluorescens*, la bande à 1238  $\text{cm}^{-1}$  est décalée vers 1224  $\text{cm}^{-1}$ , et sa largeur à mi-hauteur diminue par rapport à la signature bactérienne. Son décalage peut être lié aux variations des liaisons hydrogène [318, 319, 321] notamment au niveau des têtes polaires des phospholipides [319]. On observe également dans certains cas l'apparition des épaulements vers 1240 et 1210  $\text{cm}^{-1}$ , ce dernier peut être associé avec des groupements  $\text{PO}_2^-$  des acides nucléiques et / ou aux groupements polyphosphate protonés [314].

D'autre part, on observe un changement du profil spectral dans la région de 1160 à 950  $\text{cm}^{-1}$ , notamment la disparition des bandes à 1122, 1150 et 1084  $\text{cm}^{-1}$  et l'apparition d'une bande vers 1076  $\text{cm}^{-1}$  et des épaulements vers 1092 et 1030  $\text{cm}^{-1}$ . La bande à 1076  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique du groupement  $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $\nu_{\text{as}}$  P-O-H) [327]. On peut attribuer ce massif principalement aux phospholipides. L'absence de la bande à 1085  $\text{cm}^{-1}$  et de celle à 1155  $\text{cm}^{-1}$



suggère que la contribution des acides nucléiques et des polysaccharides est en effet très faible.

La signature révélée dans les spectres montre principalement des bandes caractéristiques des phospholipides et des protéines à savoir les bandes des elongations du groupement CH<sub>2</sub> dont le profil est caractéristique des lipides et les bandes d'elongation du groupement phosphate pour les phospholipides et les bandes amides I et II pour les protéines, la bande amide A est toutefois peu visible. Ce qui suggère qu'il n'y a pas ou peu de production d'acides nucléiques et de polysaccharides du moins en quantité au cours de la circulation du LB/10. On peut supposer toutefois que les bactéries restent métaboliquement actives puisque le signal augmente tout au long de la circulation du LB/10, cependant, il est difficile de déterminer la nature précise des composés formés. Ils peuvent correspondre aux déchets métaboliques et / ou aux débris membranaires.

Pour étudier l'état bactérien à la fin de la circulation du LB/10, nous avons réalisé le test d'intégrité membranaire (*BacLight*<sup>TM</sup>). La Figure V.15 montre en particulier deux exemples des images enregistrées par microscopie à épifluorescence. Dans ces images, la fluorescence verte est une fluorescence interne provenant de la GFP mais aussi du SYTO<sup>®</sup> 9, ces images sont moins perturbées par la présence simultanée de ces deux chromophores que celles enregistrées sur le biofilm formé à pH 7, probablement parce que la fluorescence du GFP est atténuée à un pH inférieur à cinq [328-330] ou aussi les bactéries peuvent en produire moins sous conditions de stress [331].

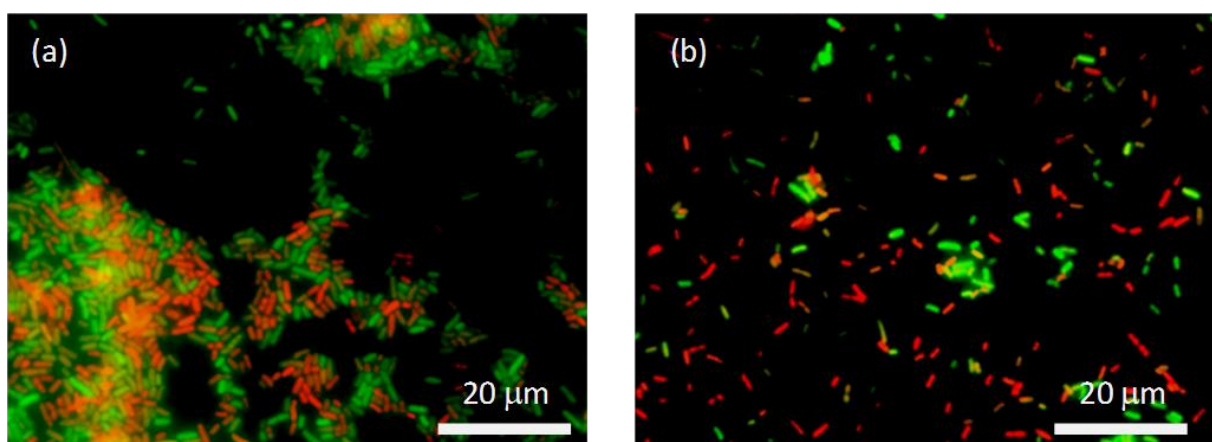


Figure V.15 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d'*E. coli* exprimant la GFP (fluorescence verte) de 24 h formé à pH 3 suite au test *BacLight*<sup>TM</sup>, a et b correspondent à deux régions d'un même biofilm

Contrairement au biofilm formé à pH 7, où la fréquence des bactéries qui fluorescent en rouge était très faible, la majorité des bactéries du biofilm formé à pH 3 montrent une fluorescence rouge, témoin de membranes bactériennes endommagées. Les bactéries forment une monocouche hétérogène à la surface du cristal avec la présence des régions où les bactéries semblent être très endommagées (Figure V.15.b). Nous avons calculé un taux de recouvrement de 35 % contre 70 % dans le cas de biofilm de référence. Un taux de recouvrement comparable a été calculé à la fin de circulation de la suspension bactérienne (32%). Le milieu acide (pH 3) semble donc déstabiliser les membranes bactériennes et ralentir fortement le développement du biofilm. D'après ces observations, la signature révélée dans les spectres IR peut être attribuée, mais a priori pas exclusivement, aux débris membranaires. Les bactéries ne sont pas toutes dans un état homogène, ce qui peut expliquer l'augmentation du signal tout au long de la circulation du LB. Il semblerait que certaines bactéries développent une certaine réponse et acquièrent une résistance plus ou moins importante contre le stress acide.

Pour évaluer la production du PNAG, nous avons enregistré des images par microscopie à épifluorescence après marquage du biofilm avec la WGA Alexa Fluor 895. La Figure V.16 montre deux exemples des images obtenues.

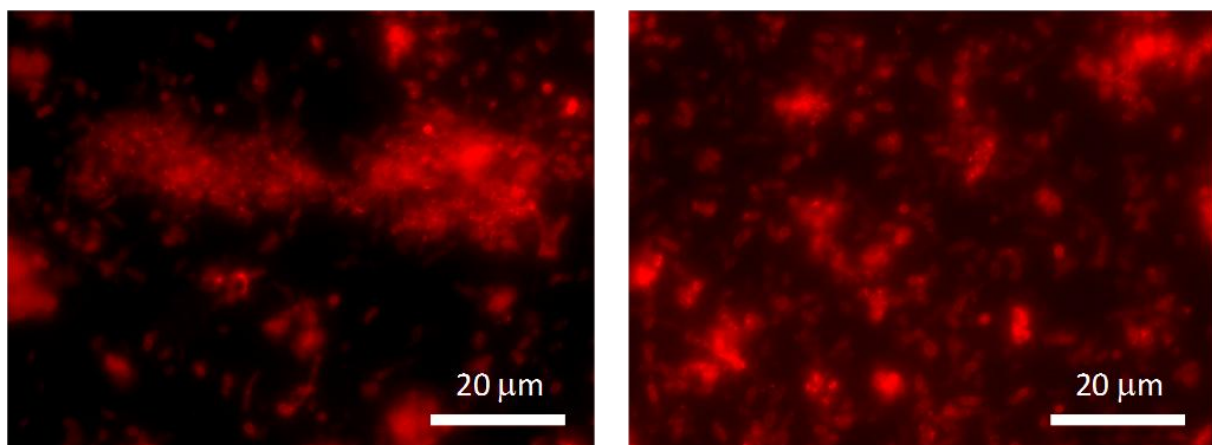


Figure V.16 : Images représentatives par microscopie à épifluorescence d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h formé à pH 3, marqué par la WGA Alexa Fluor 895 spécifique de N-acétylglucosamine et de l'acide sialique. Les deux images correspondent à deux endroits du cristal

Les images de la Figure V.16 montrent une fluorescence rouge des bactéries, témoin de la présence des résidus du N-acétylglucosamine. Cependant, la signature du PNAG n'était pas

révélee dans les spectres IR. Or, comme nous n'avons pas observé une perte de la biomasse au cours de la circulation du LB/10, le PNAG détecté peut correspondre au PNAG formé durant la période d'adhésion bactérienne, ou alors, il y a eu production d'un autre polymère à base de N-acétylglucosamine, mais les profils spectraux suggèrent fortement qu'il n'y a pas production des polysaccharides après la mise en circulation du milieu LB/10 supportant donc la première hypothèse.

Malheureusement, il ne nous a pas été techniquement possible de réaliser des spectres Raman exploitables, c'est-à-dire avec un bon rapport signal / bruit surtout dans des conditions hydratés pour compléter l'étude par spectroscopie IR. En effet, la masse bactérienne adhéree sur le substrat étant très faible, les biofilms de 24 heures formés sous condition acide couvrent environ 33 % de la surface du substrat et les bactéries se présentent sous forme isolée et dispersée et forment très peu d'amas et de colonies agrégées comme le montre les images de microscopie à épifluorescence (Figure V.15). D'autre part, des difficultés techniques nous ont empêchées d'enregistrer les spectres avec une excitation à 514 nm, nous avons rencontré également des problèmes liés probablement à la fluorescence sous une excitation à 530 nm.

## 2.2. Etude par SMFS de l'effet du développement sous condition acide de croissance sur les propriétés conformationnelles des exopolymères d'un biofilm d'*Escherichia coli* de 24 h

Nous avons étudié différentes régions de 20 x 20  $\mu\text{m}$  à la surface d'un biofilm d'*E. coli* (*E.coli* K12 – UGB E3152) de 24 h formé à pH 3, la Figure V.17 montre un exemple des cartographies de hauteur et de forces d'adhésion obtenues.

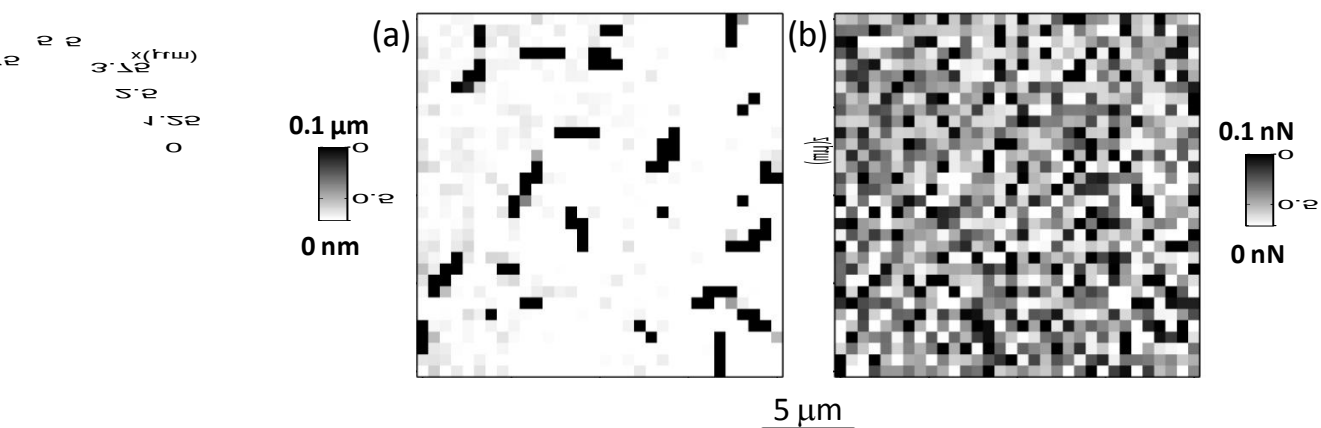


Figure V.17 : Topographie (a) et cartographie de forces d'adhésion (b) d'une région de 20 x 20  $\mu\text{m}$  de la surface d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h formé à pH 3

On observe que la surface analysée est très peu couverte par rapport au biofilm formé à pH 7 (Figure IV.28), d'ailleurs, c'était le cas pour toutes les régions analysées. Ceci peut s'expliquer par le taux de recouvrement faible de la surface qui est égale à 35 %. La Figure V.18 présente quatre exemples représentatifs de courbes de force expérimentales obtenues. Les mesures ont été réalisées en utilisant des sondes fonctionnalisées avec la WGA pour sonder spécifiquement le PNAG.

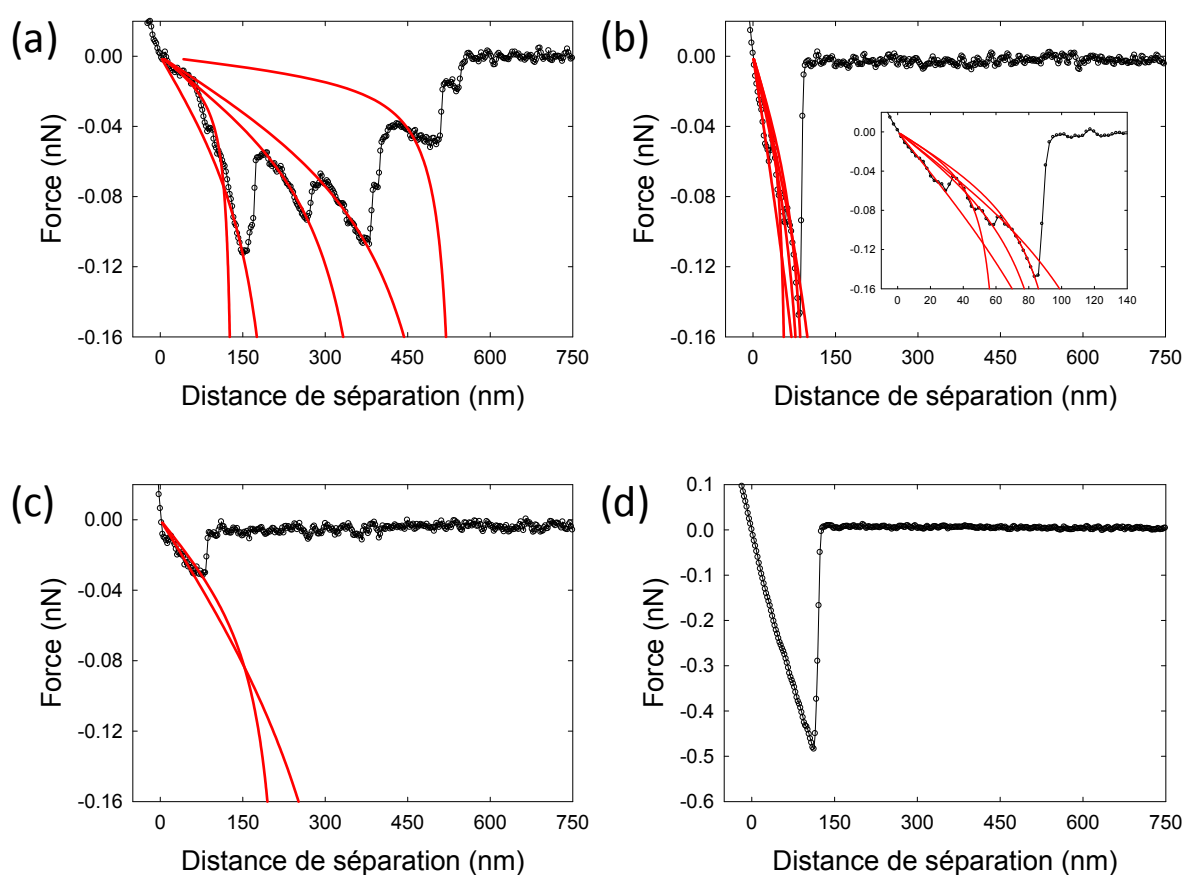


Figure V.18 : Courbes de force expérimentales représentatives (courbes de retrait) enregistrées en utilisant une sonde fonctionnalisée avec la WGA sur un biofilm d'*E. coli* K12 (UGB 3152) de 24 h formé à pH 3. Les courbes correspondent à différents endroits de la région analysée

Les courbes de force présentées dans la Figure V.18.a-c montrent une succession de pics, caractérisés par des forces allant de 0,04 à 0,12 nN. Chaque pic est attribué au dépliement d'une chaîne de polymères étirée par la sonde [287] ou au détachement d'une chaîne de la

sonde. On remarque dans certains cas comme dans l'exemple de la Figure V.18.d la présence de pics pour des distances de séparation inférieures à 200 nm ayant un niveau de force important (0,50 nN). Ces pics correspondent à des interactions non spécifiques entre la sonde et la surface de l'échantillon [287]. Contrairement à ce que nous avons observé dans le cas du biofilm formé au pH 7, où le profil des courbes de force est caractéristique d'un réseau de polymères, le profil de ces courbes de force est ici typique de l'extension de polymères simples. Ce changement reflète une diminution du taux d'enchevêtrement des exopolymères.

Pour mieux comprendre l'effet de condition acide sur les exopolymères, nous avons extrait différents paramètres conformationnelles selon le modèle FJC utilisé pour la modélisation de l'étirement des polysaccharides simples. Nous avons examiné les sept paramètres suivants : le nombre de ruptures, le nombre des monomères, les longueurs de contour  $L_c$ , les longueurs de dernière rupture  $L_{max}$ , les longueurs de Kuhn  $l_k$ , les distances entre deux ruptures successives  $\delta L$  et les forces d'adhésion. Les distributions correspondantes sont présentées dans les Figure V.19 et Figure V.20.

La Figure V.19.a montre que dans 78% de cas, aucun événement de rupture n'a été enregistré sur les courbes de force. Ainsi, la sonde détecte des exopolymères uniquement dans 22% des cycles d'approche retrait contre 45% dans le cas du biofilm formé à pH 7. En outre, nous avons calculé à partir des images de microscopie à épifluorescence un taux de recouvrement de 35% dans le cas du biofilm soumis à un stress acide et de 70% dans le cas du biofilm formé à pH 7, donc cette diminution peut être partiellement reliée au taux de recouvrement. La distribution du nombre de ruptures montre que les courbes de force présentent en moyenne 2 ruptures et au maximum cinq, ce qui reflète un taux de ramification faible des polymères étirés. La distribution des longueurs de rupture maximale est asymétrique centrée autour de 60 nm. D'autre part, les  $L_c$  montrent une distribution asymétrique centrée à 35 nm. Les valeurs des  $L_{max}$  sont très faible en comparaison à celles trouvées sur le biofilm formé à pH 7, qui ont montré une distribution très large avec des élongations arrivant jusqu'à 6000 nm (Figure V.20). Ces résultats montrent un raccourcissement possible des exopolymères étirés notamment du PNAG dans les biofilm à pH 3, mais également une diminution de l'hétérogénéité des exopolymères produits.

La distribution des valeurs de  $l_k$  présentée en Figure V.19.e est asymétrique avec des valeurs fréquentes centrées autour de 0,05 nm pour une fréquence importante de 38%, mais la distribution présente des valeurs dans une large gamme allant jusqu'à 1 nm. La valeur à 0,05 nm est légèrement inférieure à ce que nous avons obtenu sur des biofilms de *P. fluorescens* formés à pH 7 (Figure IV.18.c) et 3 (Figure V.11.c) de l'ordre de 0,056 nm et sous condition non contrôlé de pH [150] de 0,07 nm, mais elle peut être liée à l'élongation d'une molécule de sucre suivant un changement conformationnel de position de la liaison C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> [211], cette transition est de l'ordre de 0,06 nm [286].

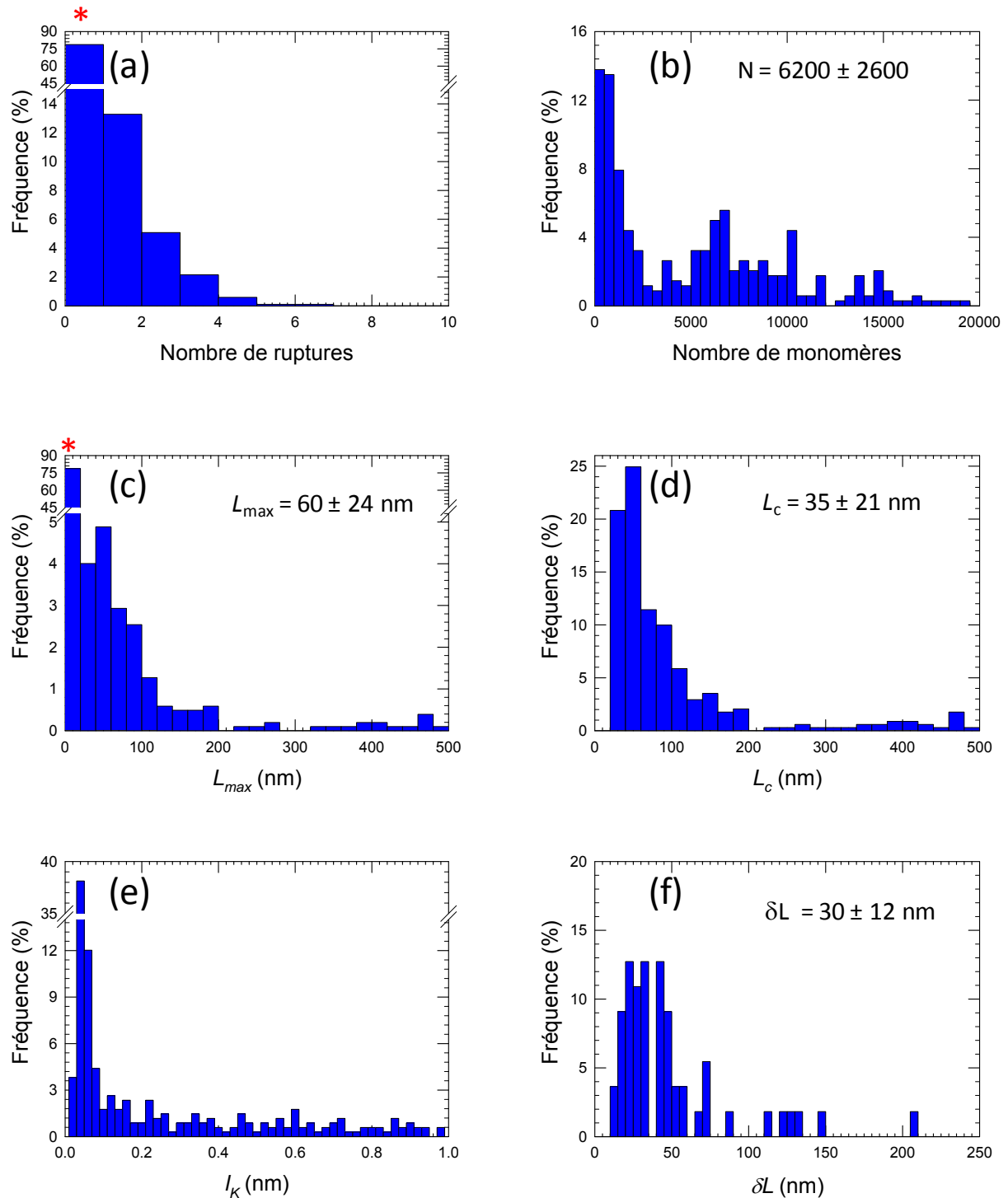


Figure V.19 : Propriétés conformationnelles des exopolymères riches en N-acétylglucosamine d'un biofilm d'*E. coli* de 24 h formé à pH 3 obtenues par SMFS avec des sondes fonctionnalisées avec la WGA. Distributions statistiques de (a) nombre de ruptures, (b) nombre des monomères, (c) longueur maximale de rupture  $L_{max}$  (d) longueur de contour  $L_c$ , (e) longueur de kuhn  $l_k$  (e) distance entre deux pics successifs  $\delta L$ . \* : pourcentage à zéro de 73%.

La Figure V.19.f montre que la distribution statistique du paramètre  $\delta L$  est asymétrique et centrée autour de 30 nm. En outre, le rapport  $L_{max}/\delta L$  est proche de deux (60/30) ce qui signifie que les molécules sont très peu ramifiées, ce rapport est d'environ 20 dans le cas des exopolymères hautement ramifiés [150].

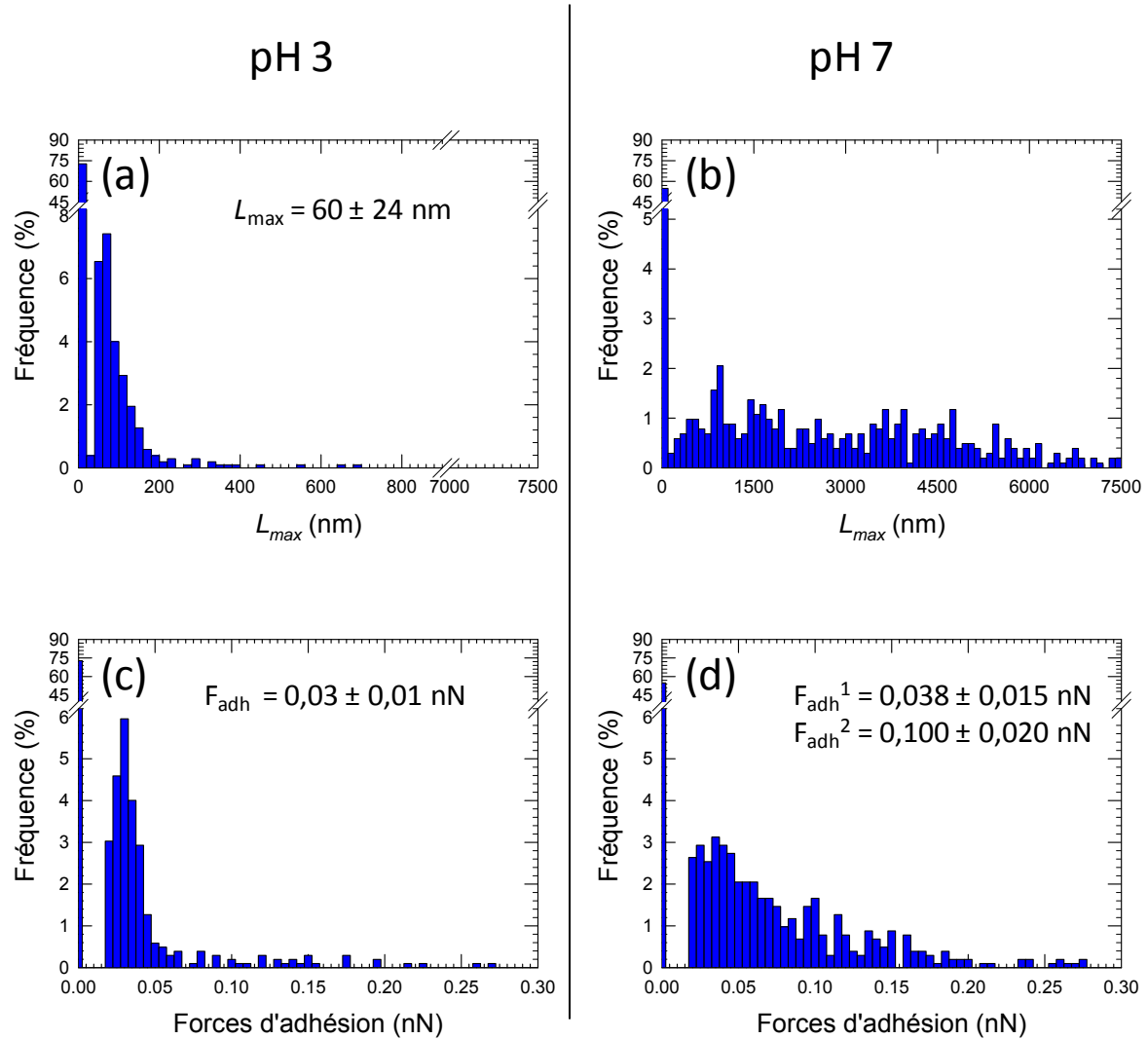


Figure V.20 : Comparaison des propriétés conformationnelles des exopolymères riches en N-acétylglucosamine d'un biofilm d'*E. coli* formé à pH 3 (a, c) et à pH 7 (b, d) ; (a, b) longueur de rupture maximale  $L_{max}$ , (c, d) force d'adhésion.

La distribution statistique des forces d'adhésion,  $F_{adh}$  est de type gaussien asymétrique centré autour de 0,030 nN contre des valeurs de l'ordre de 0,037 et 0,100 nN mesurées pour le biofilm formé à pH 7. Nous attribuons cette valeur à l'interaction unique entre une molécule de WGA et une molécule de N-acétylglucosamine même si elle est légèrement inférieure à ce qui est rapportée dans la littérature de l'ordre de 0,047 [313].



En conclusion, l'acidité du milieu influe de façon importante sur les propriétés conformationnelles de la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli*. A l'échelle moléculaire, la production des exopolymères riches en N-acétyl glucosamine formant un réseau hétérogène hautement enchevêtrés et ramifiés à pH 7, se trouve fortement réduite dans les biofilms formés à pH 3, avec des polymères largement plus courts qui sont peu ou pas ramifiés.

### 3. Discussion

---

Dans ce chapitre, nous avons étudié le développement des biofilms de *P. fluorescens* et d'*E. coli* sous condition de stress acide. Alors que le métabolisme de ces deux souches bactériennes est très différent, nous avons observé différents points communs au niveau de leur réponse vis-à-vis d'un stress acide.

L'effet immédiat du pH était révélé dans les spectres IR (Figure V.1 et Figure V.12). Nous avons constaté que la diminution du pH entraîne le rapprochement des bactéries de la surface du cristal ATR dans le cas de *P. fluorescens*, suite à la modification des charges de surface des bactéries. Par contre, dans le cas d'*E. coli*, les données spectrales ne permettent pas d'affirmer ou d'exclure un effet similaire. Or, ceci peut être relié aux différences de la structure membranaire de ces deux souches bactériennes, notamment parce que les exopolymères de la souche d'*E. coli* étudiée sont constitués majoritairement du PNAG présentant une charge partielle positive. Dans le cas de *P. fluorescens*, le changement du profil des bandes associées avec les polysaccharides témoigne que ce rapprochement est dû partiellement aux changements conformationnels des EPS qui se compactent suite à la diminution des répulsions intra et intermoléculaires, ce qu'on n'observe pas dans le cas d'*E. coli*.

Lors du stress acide à pH3 les bactéries *P. fluorescens* et *E. coli* ne semblent pas se détacher de la surface. En revanche elles cessent de se diviser mais semblent garder une certaine activité métabolique. L'évolution spectrale durant la circulation du milieu LB à pH 3 montre en effet dans les deux cas un spectre caractéristique de phospholipides et de protéines, avec très peu d'acides nucléiques et de polysaccharides, sachant que dans le cas de *P. fluorescens*,

une faible production de polysaccharides est toutefois suspectée (Figure V.2) notamment par la présence de la bande vers  $1150\text{ cm}^{-1}$ .

L'évolution spectrale a révélée deux différences entre *P. fluorescens* et *E. coli* :

- Dans le cas de *P. fluorescens*, l'intensité des bandes attribuées aux vibrations des groupements  $\text{COO}^-$  diminue et celle des  $\text{C=O}$  des esters et des acides carboxyliques augmente progressivement durant la circulation du LB/50, alors que dans le cas d'*E. coli*, on observe uniquement une augmentation progressive de la bande des  $\text{C=O}$ . Les images à épifluorescence des biofilms de 24 h (Figure V.4 et Figure V.15), révèlent que les membranes bactériennes sont endommagées dans les deux cas ce qui peut favoriser la protonation progressive des groupements  $\text{COO}^-$  des composés intracellulaires et expliquer en partie l'évolution observée dans le cas de *P. fluorescens*. Mais ceci n'explique pas pas la protonation immédiate de la majorité des groupements  $\text{COO}^-$  - du moins ceux sondés par ATR - dans le cas d'*E. coli* sachant qu'on observe dans les images à épifluorescence (Figure V.15) certaines bactéries à membranes intactes.
- L'intensité de la bande vers  $1230\text{ cm}^{-1}$  augmente par rapport à celle vers  $1085\text{ cm}^{-1}$  dans les deux cas, mais le rapport de ces deux bandes est inversé par rapport à la signature bactérienne dans le cas de *P. fluorescens* (Figure V.2) et non pour *E. coli* (Figure V.13).

D'autre part, les biofilms de 24 h ont été caractérisés. Dans le cas de *P. fluorescens*, les spectres Raman (Figure V.5) ont témoigné d'une hétérogénéité chimique importante au sein du biofilm. De même, les images à épifluorescence reflètent l'hétérogénéité morphologique des bactéries (Figure V.4). Les spectroscopies vibrationnelles ont montré une production faible des acides nucléiques et des polysaccharides dans les deux cas par rapport aux biofilms formés à pH 7, ce qui témoigne d'une diminution du métabolisme bactérien.

D'autre part, la caractérisation des exopolymères par SMFS a montré une diminution du taux de production. En effet, les interactions entre la sonde AFM et les exopolymères sondés, à savoir le glycogène et le PNAG respectivement pour *P. fluorescens* et *E. coli* ont diminué de 60 à 40% (*P. fluorescens*) et de 35 à 22% (*E. coli*). Sachant que les images de microscopie à épifluorescence ont mis en évidence également une diminution du taux de recouvrement à pH 3 par rapport à pH 7. Le pH 7 semble être donc plus favorable pour le développement du biofilm ainsi que pour la production des EPS, la diminution des EPS détectés par SMFS peut toutefois être reliée à la diminution du taux de recouvrement.

Quant aux propriétés de ces exopolymères, dans le cas de *P. fluorescens*, les données AFM permettent de distinguer deux groupes d'exopolymères étirés, un majoritaire constitué de polymères courts et peu ramifiés et un groupe de polymères longs et hautement ramifiés. Alors que les distributions statistiques ne mettent pas en évidence ces deux groupes. Ils sont témoignés par les profils des courbes de force (Figure V.8). Sachant que les données IR montrent une production faible de polysaccharides durant la circulation du LB/50 à pH 3, on peut attribuer le premier groupe aux exopolymères produits durant cette période. D'autre part, le deuxième groupe de polymères longs peut être attribué aux exopolymères produits durant la circulation de la suspension bactérienne comme le profil des courbes de force correspondantes est comparable à ceux enregistrés sur le biofilm formé à pH 7 (Figure IV.14). Par contre, dans le cas d'*E. coli*, les données AFM montrent un seul groupe de polymères courts et peu ramifiés. Par rapport aux EPS des biofilms formés à pH 7, pour lequel le PNAG forme un réseau de polymère enchevêtré, les courbes de force reflètent la présence de polymères simples. Compte tenu des données IR qui n'ont pas montré une production des polysaccharides, on peut supposer que le PNAG sondé correspond principalement à ce qui est produit durant la circulation de la suspension bactérienne. Les changements du profil des courbes de force peuvent être le résultat de la dissociation du réseau de polymères.

# **Conclusion**



L'objectif initial de ce travail était de mener une étude *in situ*, et multi-échelle pour les premières étapes de formation de jeunes biofilms de *P. fluorescens* et d'*E. coli* sous différentes conditions : i) conditions de croissance standard auxquelles le développement des biofilms est pris comme référence, ii) conditions de stress environnemental imposé à une étape précoce du développement des biofilms, le stress étudié étant la contrainte acido-basique.

Dans ce but, nous avons combiné plusieurs techniques. Les spectroscopies vibrationnelles IR en mode ATR et Raman en configuration confocale nous ont permis d'étudier, respectivement, l'évolution en temps réel de la composition chimique moyenne de la couche bactérienne en contact direct avec le cristal ATR (cristal Ge) et la composition chimique localisée au sein des biofilms de 24h. Ces études ont été réalisées *in situ* grâce à des cellules d'écoulement adaptées à chaque technique. La spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique nous a permis d'étudier les propriétés conformationnelles des exopolymères des biofilms de 24h.

La première étape a été consacrée à l'étude des empreintes spectrales Raman de *P. fluorescens* et *E. coli* planctoniques. Nous avons mis en évidence un effet Raman de résonance du cytochrome *c* bactérien, qui domine les spectres Raman de *P. fluorescens* à certaines longueurs d'onde d'excitation à savoir 514 et 530 nm. Le choix de la longueur d'onde à utiliser est ainsi particulièrement important, et est dirigé en partie par cet effet. Les signatures spectrales ont montré des variations en fonction de la phase de croissance notamment au niveau des intensités relatives des bandes. Les plus informatives étant celles associées aux acides nucléiques. Par ailleurs, la comparaison des spectres Raman des biofilms sous différents états d'hydratation a montré que l'empreinte spectrale peut, dans certains cas, changer en fonction de degré d'hydratation. Cela peut être lié à l'état d'oxydation du cytochrome *c* et le résultat subséquent sur l'effet Raman de résonance.

Dans une deuxième étape, nous avons profité de l'expertise acquise au cours de ces dernières années au laboratoire dans le suivi par FTIR-ATR des étapes initiales de la formation des biofilms de *P. fluorescens* pour étendre l'étude à un autre modèle bactérien, *E. coli*. Nous

avons donc suivi les premières étapes de formation de ces deux modèles bactériens par FTIR-ATR dans des conditions expérimentales non stressantes - optimisées préalablement pour chaque modèle bactérien à part - considérées standard de croissance. Cette étude en temps réel a été combinée à l'étude par MRC, SMFS et imagerie par épifluorescence des biofilms de 24h. Les spectres Raman ont témoigné une hétérogénéité latérale importante au sein des biofilms. Les signatures spectrales (Raman et IR) des biofilms de 24h ont suggéré, pour les deux modèles bactériens, une production plus importante des polysaccharides intra et extracellulaires à l'état sessile comparativement à l'état planctonique ainsi qu'ils ont témoigné de la complexité de ces polysaccharides. D'autre part, l'étude par SMFS a montré que les EPS étirées de ces deux modèles bactériens sont très différentes, celles de *P. fluorescens* sont des polymères longs hautement ramifiés. Par contre, celles produites par *E. coli* forment un réseau de polymères enchevêtrés qui sont largement étirables.

La compréhension du développement des biofilms dans des conditions de référence était essentielle pour l'étude dans une troisième étape de la réponse des biofilms à un stress environnemental à savoir une diminution de pH. L'étude en temps réel par FTIR-ATR a permis de distinguer entre deux types d'effets de pH : les effets immédiats liés directement à la protonation de certains groupements chimiques à pH 3, et les effets « différés » qui sont le résultat du changement du métabolisme bactérien en réponse au stress du pH. Nous avons pu détecter le rapprochement presque immédiat des cellules bactériennes dans le cas de *P. fluorescens* de la surface du cristal ATR. En revanche, dans le cas d'*E. coli*, l'effet immédiat du pH semble être plus complexe, cela peut provenir en partie de sa production du PNAG ayant une charge partiellement positive. D'autre part, l'évolution des spectres IR-ATR montre un profil dominé par les signaux de lipides et suggère une production faible de protéines, d'acides nucléiques et de polysaccharides reflétant une activité métabolique dont la nature pour l'instant est peu précise, les bactéries se divisant toutefois peu. Ces variations métaboliques ont été mises en évidence à une échelle localisée par MRC dans les cas de *P. fluorescens*. De même, les images à épifluorescence ont montré que la biomasse à la surface de cristal évolue très peu par rapport au moment de l'introduction du stress acide. Les mesures par SMFS ont montré une diminution de la production des exopolymères sondés. Quant à leurs propriétés conformationnelles, nous avons enregistré le raccourcissement de ceux-ci et la diminution de leurs taux de ramification sous l'action du stress acide.

La mise en place des études combinant plusieurs techniques d'étude *in situ* est d'une grande importance dans l'étude des biofilms, vue leur structure complexe facilement altérée par les

techniques d'échantillonnage et de préparation. En effet, chaque technique permet d'extraire à une échelle différente des informations d'intérêt afin d'assembler une vision plus complète et représentative caractérisant les biofilms. L'un des objectifs de ce travail était en effet de savoir si les techniques initialement choisies à savoir la FTIR-ATR, la MRC, la SMFS et la microscopie à épifluorescence constituent une bonne combinaison permettant l'étude *in situ* des propriétés physico-chimiques des biofilms notamment lors des premières étapes de leur formation. Comme nous l'avons vu, ces différentes techniques permettent d'explorer aux différentes échelles les jeunes biofilms. La caractérisation des biofilms de 24h permet de mieux interpréter les résultats de suivi *in situ* par FTIR-ATR, mais aussi de lancer différentes hypothèses pour expliquer les variations spectrales observées lors du suivi *in situ*.

Pour l'instant, la caractérisation des biofilms par les différentes techniques a été faite uniquement pour les biofilms de 24h. Ceci étant, afin de mieux comprendre le développement des biofilms formés à pH 3, la caractérisation complète des biofilms à la fin de circulation de la suspension bactérienne avant l'introduction du stress acide est nécessaire. Les mesures en SMFS permettront éventuellement de faire la différence entre les EPS produites durant cette période et celles produites durant la circulation de LB à pH 3. D'autre part, les analyses Raman permettront d'évaluer l'état d'hétérogénéité à ce stade très précoce de la formation des biofilms. Par la suite, la caractérisation des biofilms formés à pH 7 et 3 à différents temps de circulation de LB pourra éventuellement classer chronologiquement les différents phénomènes mis en jeu, notamment l'endommagement des membranes bactériennes, l'inversion du rapport  $I_{1220} / I_{1067}$  dans les spectres IR-ATR, la production des polymères courts dans le cas de *P. fluorescens* et / ou la dissociation du réseau de polymères dans le cas d'*E. coli*, cela permettra de mieux comprendre la réponse bactérienne. Il est à noter également que la caractérisation des EPS par SMFS est partielle compte tenu de la fonctionnalisation des sondes AFM. L'utilisation d'autre lectines que celles utilisées dans ce travail à savoir la ConA et la WGA respectivement pour *P. fluorescens* et *E. coli* permettra de mieux caractériser les EPS. Comme les résultats IR-Raman ont montré une nature complexe de polysaccharides intra et extracellulaires produits.

De même, l'exploitation de l'ensemble des données à savoir aux différents pHs, permettra d'éclaircir différents points. Par exemple, la comparaison de ces résultats à ceux pour le pH 9 permettra de mieux comprendre l'effet immédiat du pH. Ainsi, la comparaison de deux



modèles bactériens peut également se faire dans ce sens, comme ils n'ont pas les mêmes structures de surface.

D'autre part, les résultats IR suggèrent que les bactéries restent métaboliquement actives à pH 3, mais elles se divisent très peu. Pour comprendre à quel point le stress acide endommage les bactéries, il faudra étudier l'effet de les soumettre aux cycles de développement sous conditions stressantes et non stressantes. Cela permettra de savoir si les effets du pH ou alors les phénomènes déclenchés comme réponse au stress acide sont réversibles ou pas, et dans le cas où elles le sont, si un autre cycle de stress acide déclenchera les mêmes réponses ou si les bactéries deviennent plus résistantes. Cela pourra apporter des éléments supplémentaires pour orienter l'attribution précise de la signature révélée dans les spectres IR-ATR au cours de la circulation du LB à pH 3.

Il sera intéressant également d'étudier l'effet d'autres stress environnementaux comme par exemple la contrainte hydrodynamique ou l'ajout des biocides. Cela permettra de tirer les traits communs et/ ou différents caractérisant la réponse des biofilms à tel ou tel stress environnemental.

## Références bibliographiques

1. Zobell, C.E., *The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity*. Journal of Bacteriology, 1943. **46**(1): p. 39-56.
2. Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. Cheng, *How bacteria stick*. Scientific American, 1978. **238**(1): p. 86-&.
3. Lawrence, J.R., et al., *Optical sectioning of microbial biofilms*. Journal of Bacteriology, 1991. **173**(20): p. 6558-6567.
4. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15**(2): p. 167-193.
5. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-1322.
6. Allan, J.D., *Stream Ecology. Structure and function of running waters*. 1995, London: Chapman & Hall.
7. Battin, T.J., et al., *Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 439-442.
8. Sabater, S., et al., *The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality*. Hydrobiologia, 2002. **469**(1-3): p. 149-156.
9. Seneviratne, G., et al., *Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils*. Soil Biology and Biochemistry, 2011. **43**(5): p. 1059-1062.
10. Kumar, D. and S.P. Adhikary, *Diversity, molecular phylogeny, and metabolic activity of cyanobacteria in biological soil crusts from Santiniketan (India)*. Journal of Applied Phycology, 2015. **27**(1): p. 339-349.
11. Bergman, B., et al., *N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria*. Fems Microbiology Reviews, 1997. **19**(3): p. 139-185.
12. Dunne, W.M., *Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?* Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15**(2): p. 155-166.
13. Al-Mailem, D.M., M.K. Kansour, and S.S. Radwan, *Hydrocarbonoclastic biofilms based on sewage microorganisms and their application in hydrocarbon removal in liquid wastes*. Canadian Journal of Microbiology, 2014. **60**(6): p. 477-486.
14. Kim, J.R., et al., *Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells*. Bioresource Technology, 2007. **98**(13): p. 2568-2577.
15. Parot, S., *Biofilms électroactifs: Formation, caractérisation et mécanismes*. 2007.
16. Rosche, B., et al., *Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis?* Trends in biotechnology, 2009. **27**(11): p. 636-643.
17. Reimers, C.E., et al., *Harvesting energy from the marine sediment-water interface*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(1): p. 192-195.
18. Gao, C., et al., *Enrichment of anodic biofilm inoculated with anaerobic or aerobic sludge in single chambered air-cathode microbial fuel cells*. Bioresource Technology, 2014. **167**: p. 124-132.
19. Cook, R.J., *Making Greater Use of Introduced Microorganisms for Biological Control of Plant Pathogens*. Annual Review of Phytopathology, 1993. **31**(1): p. 53-80.
20. Geels, F.P. and B. Schippers, *Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed treatments with antagonistic fluorescent Pseudomonas spp.* Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology, 1983. **108**(3-4): p. 207-214.

21. Duffy, B.K. and G. Defago, *Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by Pseudomonas fluorescens biocontrol strains*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(6): p. 2429-2438.
22. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on humane-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-818.
23. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-1920.
24. Berry, D., C. Xi, and L. Raskin, *Microbial ecology of drinking water distribution systems*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(3): p. 297-302.
25. Flemming, H.-C., et al., *Industrial Biofilms and their Control*, in *Marine and Industrial Biofouling*. 2009, Springer Berlin Heidelberg. p. 65-101.
26. Choi, D.H., et al., *Bacterial diversity in biofilms formed on condenser tube surfaces in a nuclear power plant*. Biofouling, 2010. **26**(8): p. 953-959.
27. Mattilasandholm, T. and G. Wirtanen, *Biofilm formation in the industry - a review*. Food Reviews International, 1992. **8**(4): p. 573-603.
28. Jakubek, D., et al., *The impact of monochloramine on the diversity and dynamics of Legionella pneumophila subpopulations in a nuclear power plant cooling circuit*. Fems Microbiology Ecology, 2013. **85**(2): p. 302-312.
29. Srey, S., I.K. Jahid, and S.-D. Ha, *Biofilm formation in food industries: A food safety concern*. Food Control. **31**(2): p. 572-585.
30. Abdallah, M., et al., *Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments*. Archives of Microbiology, 2014. **196**(7): p. 453-472.
31. Naves, P.n., et al., *Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by Escherichia coli strains*. Microbial Pathogenesis, 2008. **45**(2): p. 86-91.
32. Hellard, M.E., et al., *A randomized, blinded, controlled trial investigating the gastrointestinal health effects of drinking water quality*. Environmental Health Perspectives, 2001. **109**(8): p. 773-778.
33. Delille, A., *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*, in *faculté des sciences et technologies*. 2007, Université Henri Poincaré: Nancy.
34. Vu, B., et al., *Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation*. Molecules, 2009. **14**(7): p. 2535-2554.
35. Scheuer, P., et al., *Epibiosis of Marine Algae and Benthic Invertebrates: Natural Products Chemistry and Other Mechanisms Inhibiting Settlement and Overgrowth*, in *Bioorganic Marine Chemistry*. 1989, Springer Berlin Heidelberg. p. 85-114.
36. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Review of Microbiology, 2002. **56**: p. 187-209.
37. Donlan, R.M., *Biofilms: Microbial life on surfaces*. Emerging Infectious Diseases, 2002. **8**(9): p. 881-890.
38. Compere, C., *Biofilms en milieu marin*. Techniques sciences méthodes, 1999(11): p. 48-54.
39. Ellwood, D.C., et al., *Surface-associated growth*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1982. **297**(1088): p. 517-532.
40. Williams, V. and M. Fletcher, *Pseudomonas fluorescens adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(1): p. 100-4.

41. Conrad, J.C., *Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation*. Research in Microbiology, 2012. **163**(9-10): p. 619-629.
42. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Molecular Microbiology, 1998. **30**(2): p. 295-304.
43. Sheng, G.-P., H.-Q. Yu, and X.-Y. Li, *Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(6): p. 882-894.
44. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(9): p. 623-633.
45. Tolker-Nielsen, T. and S. Molin, *Spatial organization of microbial biofilm communities*. Microbial Ecology, 2000. **40**(2): p. 75-84.
46. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J.Bacteriol., 2002. **184**(4): p. 1140-1154.
47. Prigent-Combaret, C., et al., *Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(19): p. 5993-6002.
48. Kaplan, J.B., *Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses*. Journal of Dental Research, 2010. **89**(3): p. 205-218.
49. Solano, C., M. Echeverz, and I.i. Lasa, *Biofilm dispersion and quorum sensing*. Current Opinion in Microbiology, 2014. **18**(0): p. 96-104.
50. Stoodley, P., et al., *Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(12): p. 5608-5613.
51. Liu, Y. and H.H.P. Fang, *Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2003. **33**(3): p. 237-273.
52. d'Abzac, P., et al., *Characterization of the Mineral Fraction Associated to Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Anaerobic Granular Sludges*. Environmental Science & Technology, 2010. **44**(1): p. 412-418.
53. Onbasli, D. and B. Aslim, *Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some Pseudomonas spp. strains*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **168**(1): p. 64-67.
54. Moryl, M., et al., *Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in Proteus mirabilis biofilm*. Acta Biochimica Polonica, 2013. **61**(1): p. 133-139.
55. Dignac, M.F., et al., *Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure*. Water Science and Technology, 1998. **38**(8-9): p. 45-53.
56. Ramesh, A., D.-J. Lee, and S.G. Hong, *Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **73**(1): p. 219-225.
57. Rosenberger, S. and M. Kraume, *Filterability of activated sludge in membrane bioreactors*. Desalination, 2003. **151**(2): p. 195-200.
58. Evans, L.V., *Biofilms: recent advances in their study and control*. 2003: CRC press.
59. Wang, X., J.F. Preston, and T. Romeo, *The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(9): p. 2724-2734.
60. Rohde, H., et al., *Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of*

- biomaterial-associated infections*. European Journal of Cell Biology, 2010. **89**(1): p. 103-111.
61. Vuong, C., et al., *A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(52): p. 54881-54886.
  62. Beech, I.B., et al., *Extracellular polysaccharides from Desulfovibrio desulfuricans and Pseudomonas fluorescens in the presence of mild and stainless steel*. Appl.Microbiol.Biotechnol., 1991. **35**: p. 65-71.
  63. Kives, J., B. Orgaz, and C. SanJose, *Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from Pseudomonas fluorescens B52*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2006. **52**(2): p. 123-127.
  64. Hung, C.C., P.H. Santschi, and J.B. Gillow, *Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by Pseudomonas fluorescens Biovar II*. Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(2): p. 141-147.
  65. Quilès, F. and F. Humbert, *On the production of glycogen by Pseudomonas fluorescens during biofilm development: an in situ study by attenuated total reflection-infrared with chemometrics*. Biofouling, 2014. **30**(6): p. 709-18.
  66. Ude, S., et al., *Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates*. Environmental Microbiology, 2006. **8**(11): p. 1997-2011.
  67. Spiers, A.J., et al., *Biofilm formation at the air-liquid interface by the Pseudomonas fluorescens SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose*. Molecular Microbiology, 2003. **50**(1): p. 15-27.
  68. Gal, M., et al., *Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of Pseudomonas fluorescens SBW25 on plant surfaces*. Molecular Ecology, 2003. **12**(11): p. 3109-3121.
  69. Sutherland, I.W., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology-Uk, 2001. **147**: p. 3-9.
  70. Mah, T.F.C. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends in Microbiology, 2001. **9**(1): p. 34-39.
  71. Lugtenberg, B., *Composition and function of the outer-membrane of Escherichia-coli*. Trends in Biochemical Sciences, 1981. **6**(10): p. 262-266.
  72. Lugtenberg, B. and L. Vanalphen, *Molecular architecture and functioning of the outer-membrane of Escherichia-coli and other Gram-negative bacteria*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1983. **737**(1): p. 51-115.
  73. Schleife.Kh and O. Kandler, *Peptidoglycan types of bacterial cell-walls and their taxonomic implications*. Bacteriological Reviews, 1972. **36**(4): p. 407-477.
  74. Hantke, K. and V. Braun, *Covalent binding of lipid to protein - diglyceride and Amide-linked fatty-acid at N-terminal end of Murein-lipoprotein of Escherichia-coli outer membrane*. European Journal of Biochemistry, 1973. **34**(2): p. 284-296.
  75. An, Y.H. and R.J. Friedman, *Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces*. J.Biomed.Mater Res.(Appl.Biomater.), 1998. **43**: p. 338-348.
  76. Klemm, P. and M.A. Schembri, *Bacterial adhesins: function and structure*. International Journal of Medical Microbiology, 2000. **290**(1): p. 27-35.
  77. Capitani, G., et al., *Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from Escherichia coli*. Microbes and Infection, 2006. **8**(8): p. 2284-2290.
  78. Pereira, M.O., et al., *Effect of flow regime on the architecture of a Pseudomonas fluorescens biofilm*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. **78**(2): p. 164-171.

79. Stoodley, P., et al., *Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **65**(1): p. 83-92.
80. Abe, Y., et al., *Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms* Water Research, 2012: p. Submitted.
81. Gottschal, J.C., *substrate capturing and growth in various ecosystems*. Journal of Applied Bacteriology, 1992. **73**: p. S39-S48.
82. Humbert, F., F. Quilès, and A. Delille, *In situ assesment of drinking water biostability using nascent reference biofilm ATR-FTIR fingerprint*, in *BioMicroworld2007 Conference Proceedings Book : "Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology"*, A. Mendez-Vilas, Editor. 2009, World Scientific Publishing Co. Pte Ltd. p. 268-272.
83. Steinberger, R.E., et al., *Elongation correlates with nutrient deprivation in Pseudomonas aeruginosa-unsaturated biofilms*. Microbial Ecology, 2002. **43**(4): p. 416-423.
84. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis*. Molecular Microbiology, 1998. **28**(3): p. 449-461.
85. McWhirter, M.J., A.J. McQuillan, and P.J. Bremer, *Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of Pseudomonas aeruginosa attachment to ZnSe and to TiO<sub>2</sub> monitored by ATR-IR spectroscopy*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2002. **26**(4): p. 365-372.
86. McWhirter, M.J., P.J. Bremer, and A.J. McQuillan, *Direct Infrared Spectroscopic Evidence of pH- and Ionic Strength-Induced Changes in Distance of Attached Pseudomonas aeruginosa from ZnSe Surfaces*. Langmuir, 2002. **18**(5): p. 1904-1907.
87. Jung, J.-H., N.-Y. Choi, and S.-Y. Lee, *Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by Cronobacter sakazakii depending on environmental conditions*. Food Microbiology, 2013. **34**(1): p. 70-80.
88. Peng, J.S., W.C. Tsai, and C.C. Chou, *Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **77**(1-2): p. 11-18.
89. Kumar, A. and Y.-P. Ting, *Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2013. **111**: p. 747-754.
90. Dynes, J.J., et al., *Morphological and biochemical changes in Pseudomonas fluorescens biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents*. Canadian Journal of Microbiology, 2009. **55**(2): p. 163-178.
91. Humbert, F., et al., *In situ assessment of antibacterial activity of dermaseptine S4 derivatives against Pseudomonas fluorescens nascent biofilms by using ATR-FTIR spectroscopy*. Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, 2012: p. 547-550.
92. Meyer, B., *Approaches to prevention, removal and killing of biofilms*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. **51**(4): p. 249-253.
93. Chen, L. and Y.-m. Wen, *The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies*. International Journal of Oral Science, 2011. **3**(2): p. 66-73.
94. Jahid, I.K. and S.D. Ha, *The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014. **13**(5): p. 990-1011.
95. Joo, H.-S. and M. Otto, *Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens*. Chemistry & Biology, 2012. **19**(12): p. 1503-1513.

96. de la Fuente-NÃ±ez, C.s., et al., *Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies*. Current Opinion in Microbiology, 2013. **16**(5): p. 580-589.
97. Ferreira, C., et al., *Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology*. Appl Microbiol, 2010: p. 845-854.
98. Cremet, L., et al., *Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of Escherichia coli*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **75**(3): p. 252-255.
99. Shi, H., et al., *Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial - Escherichia coli infection in China*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015. **14**.
100. Wu, J.-n., et al., *Epidemiology and microbiology of nosocomial bloodstream infections: analysis of 482 cases from a retrospective surveillance study*. Journal of Zhejiang University-Science B, 2015. **16**(1): p. 70-77.
101. Shiue, E., I.M. Brockman, and K.L.J. Prather, *Improving product yields on D-glucose in Escherichia coli via knockout of pgi and zwf and feeding of supplemental carbon sources*. Biotechnology and Bioengineering, 2015. **112**(3): p. 579-587.
102. Barbieri, R., et al., *Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococci causing breast peri-implant infections in oncologic patients*. BMC Microbiology, 2015. **15**.
103. Zhao, G., et al., *Effects of antimicrobial peptides on Staphylococcus aureus growth and biofilm formation in vitro following isolation from implant-associated infections*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015. **8**(1): p. 1546-1551.
104. <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque>. 2012.
105. Kim, C., et al., *Isolation of Legionella pneumophila From Cooling Towers, Public Baths, Hospitals, and Fountains in Seoul, Korea, From 2010 to 2012*. Journal of Environmental Health, 2015. **77**(6): p. 58-62.
106. Qin, T., et al., *Distribution of sequence-based types of Legionella pneumophila serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China*. Applied and Environmental Microbiology, 2014. **80**(7): p. 2150-2157.
107. Flügge, K.G.F.W., *Die mikroorganismen*. Vol. 1. 1896: FCW Vogel.
108. Stanier RY, P.N., Doudoroff M, *The aerobic pseudomonads: a taxonomic study*. Journal of general microbiology, 1966. **43**(2): p. 159-272.
109. Dufour, D., et al., *Molecular typing of industrial strains of Pseudomonas spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **125**(2): p. 188-196.
110. Caldera, L. and L. Franzetti, *Effect of Storage Temperature on the Microbial Composition of Ready-to-Use Vegetables*. Current Microbiology. **68**(2): p. 133-139.
111. Harjai, K., et al., *Leaf extract of Azadirachta indica (neem): a potential antibiofilm agent for Pseudomonas aeruginosa*. Pathogens and Disease. **69**(1): p. 62-65.
112. Allison, D.G., et al., *Extracellular products as mediators of the formation and detachment of Pseudomonas fluorescens biofilms*. FEMS Microbiology Letters, 1998. **167**(2): p. 179-184.
113. Van Der Kooij, D., A. Visser, and J.P. Oranje, *Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentrations in tap water*. Antonie van Leeuwenhoek, 1982. **48**(3): p. 229-243.

114. Shen, L.L., et al., *Control of tobacco mosaic virus by Pseudomonas fluorescens CZ powder in greenhouses and the field*. Crop Protection, 2013. **56**: p. 87-90.
115. Delaquis, P.J., et al., *Detachment of Pseudomonas fluorescens from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress*. Microb.Ecol., 1989. **18**(3): p. 199-210.
116. Korber, D.R., J.R. Lawrence, and D.E. Caldwell, *Effect of motility on surface colonization and reproductive success of Pseudomonas fluorescens in dual-dilution continuous culture and batch culture systems*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(5): p. 1421-1429.
117. Quilès, F., F. Humbert, and A. Delille, *Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of Pseudomonas fluorescens from planktonic state to nascent biofilm state*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **75**(2): p. 610-616.
118. Delille, A., F. Quilès, and F. Humbert, *In situ monitoring of the nascent Pseudomonas fluorescens biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(18): p. 5782-5788.
119. Mainil, J., *Escherichia coli virulence factors*. Veterinary Immunology and Immunopathology. **152**(152): p. 2-12.
120. Grimont, P.A.D., *Taxonomie des Escherichia*. Médecine et Maladies Infectieuses, 1987. **17**, **Supplement 1**: p. 6-10.
121. Tenailon, O., et al., *The population genetics of commensal Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(3): p. 207-217.
122. Coia, J. and H. Cubie, *Escherichia coli*, in *The Immunoassay Kit Directory*. 1995, Springer Netherlands. p. 757-761.
123. Skyberg, J.A., et al., *Biofilm formation by avian Escherichia coli in relation to media, source and phylogeny*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **102**(2): p. 548-554.
124. de Brito, B.G., L.C.J. Gaziri, and M.C. Vidotto, *Virulence factors and clonal relationships among Escherichia coli strains isolated from broiler chickens with cellulitis*. Infection and Immunity, 2003. **71**(7): p. 4175-4177.
125. <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/escherichia-coli>. 2012.
126. Jacobsen, S.M., et al., *Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Reviews, 2008. **21**(1): p. 26-+.
127. Riley, M., et al., *Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot - 2005*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(1): p. 1-9.
128. Agladze, K., D. Jackson, and T. Romeo, *Periodicity of cell attachment patterns during Escherichia coli biofilm development*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(18): p. 5632-5638.
129. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-275.
130. Dubois, M., et al., *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**: p. 350-356.
131. Comte, S., G. Guibaud, and M. Baudu, *Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **38**(1-2): p. 237-245.
132. Bhaskar, P.V. and N.B. Bhosle, *Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain*. Environment International, 2006. **32**(2): p. 191-198.



133. Park, C. and J.T. Novak, *Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods*. Water Research, 2007. **41**(8): p. 1679-1688.
134. Wingender, J., et al., *Extraction of EPS*, in *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. 1999, Springer Berlin Heidelberg. p. 49-72.
135. Zhang, X.Q., P.L. Bishop, and B.K. Kinkle, *Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms*. Water Science and Technology, 1999. **39**(7): p. 211-218.
136. Comte, S., G. Gulbaud, and M. Baudu, *Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound*. Process Biochemistry, 2006. **41**(4): p. 815-823.
137. Gong, A.S., et al., *Extraction and Analysis of Extracellular Polymeric Substances: Comparison of Methods and Extracellular Polymeric Substance Levels in Salmonella pullorum SA 1685*. Environmental Engineering Science, 2009. **26**(10): p. 1523-1532.
138. Henrici, A.T., *Studies of freshwater bacteria I A direct microscopic technique*. Journal of Bacteriology, 1933. **25**(3): p. 277-287.
139. Wolf, G., J.G. Crespo, and M.A.M. Reis, *Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring*. Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology, 2002. **1**: p. 227-251.
140. Lazarova, V. and J. Manem, *Biofilm characterization and activity analysis in water and waste-water treatment*. Water Research, 1995. **29**(10): p. 2227-2245.
141. Quilès, F., et al., *Production of Extracellular Glycogen by Pseudomonas fluorescens: Spectroscopic Evidence and Conformational Analysis by Biomolecular Recognition*. Biomacromolecules, 2012. **13**(7): p. 2118-2127.
142. McFeters, G.A., et al., *Physiological methods to study biofilm disinfection*. Journal of industrial microbiology, 1995. **15**(4): p. 333-338.
143. Batista, J.F., et al., *In situ corrosion control in industrial water systems*. Biodegradation, 2000. **11**(6): p. 441-448.
144. Little, B., et al., *Biofilms - An ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation*. Journal of industrial microbiology, 1991. **8**(4): p. 213-221.
145. Kamjunke, N., et al., *Use of confocal laser scanning microscopy for biofilm investigation on paints under field conditions*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012. **69**: p. 17-22.
146. Stewart, P.S., et al., *Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods*. Water Research, 1995. **29**(8): p. 2006-2009.
147. Schmitt, J. and H.C. Flemming, *FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis*. International Biodeterioration and Biodegradation, 1998. **41**(1): p. 1-11.
148. Nivens, D., R.J. Palmer, Jr., and D.C. White, *Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques*. Journal of Industrial Microbiology, 1995. **15**: p. 263-276.
149. Nivens, D., et al., *Monitoring microbial adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy*. Journal of Microbiological Methods, 1993. **17**: p. 199-213.
150. Fahs, A., et al., *In Situ Analysis of Bacterial Extracellular Polymeric Substances from a Pseudomonas fluorescens Biofilm by Combined Vibrational and Single Molecule Force Spectroscopies*. Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(24): p. 6702-6713.
151. Nivens, D.E., et al., *Multichannel ATR/FT-IR spectrometer for on-line examination of microbial biofilms*. Applied Spectroscopy, 1993. **47**(5): p. 668-671.

152. Elzinga, E.J., et al., *ATR-FTIR Spectroscopy Study of the Influence of pH and Contact Time on the Adhesion of Shewanella putrefaciens Bacterial Cells to the Surface of Hematite*. Environmental Science & Technology, 2012. **46**(23): p. 12848-12855.
153. Suci, P.A., et al., *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994. **38**(9): p. 2125-2133.
154. Suci, P.A., J.D. Vransky, and M.W. Mittelman, *Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy*. Biomaterials, 1998. **19**(4-5): p. 327-339.
155. Kang, S.Y., et al., *Monitoring Metal Ion Binding in Single-Layer Pseudomonas aeruginosa Biofilms Using ATR-IR Spectroscopy*. Langmuir, 2006. **22**(1): p. 286-291.
156. Parikh, S.J. and J. Chorover, *FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-oxide formation by Pseudomonas putida GB-1*. Geomicrobiology Journal, 2005. **22**(5): p. 207-218.
157. Suci, P.A., et al., *Combined light microscopy and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(11): p. 4600-4603.
158. Huang, W.E., et al., *Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(15): p. 4452-4458.
159. Meisel, S., et al., *Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy*. Food Microbiology, 2014. **38**: p. 36-43.
160. Maquelin, K., et al., *Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(1): p. 12-19.
161. Rosch, P., et al., *The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy*. Journal of Molecular Structure, 2003. **661**: p. 363-369.
162. Harz, M., et al., *Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions*. Analyst, 2005. **130**(11): p. 1543-1550.
163. Patzold, R., et al., *In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy*. Journal of Microbiological Methods, 2008. **72**(3): p. 241-248.
164. Kniggendorf, A.-K. and M. Meinhardt-Wollweber, *Of microparticles and bacteria identification - (resonance) Raman micro-spectroscopy as a tool for biofilm analysis*. Water Research, 2011. **45**(15): p. 4571-4582.
165. Kairyte, K., Z. Luksiene, and V. Sablinskas, *Identification of different Listeria monocytogenes strains by surface enhanced FT Raman spectroscopy*. Cheminė Technologija 2012. **3**(61): p. 46-49.
166. Rusciano, G., et al., *Raman spectroscopy as a new tool for early detection of bacteria in patients with cystic fibrosis*. Laser Physics Letters, 2013. **10**(7).
167. Schuster, K.C., et al., *Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(22): p. 5529-5534.
168. Huang, W.E., et al., *Single-cell Raman spectral profiles of Pseudomonas fluorescens SBW25 reflects in vitro and in planta metabolic history*. Microbial Ecology, 2007. **53**(3): p. 414-425.
169. Schuster, K.C., E. Urlaub, and J.R. Gapes, *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, 2000. **42**(1): p. 29-38.

170. Sandt, C., et al., *Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ* Journal of Applied Microbiology, 2007. **130**: p. 1808-1820.
171. Marcotte, L., J. Barbeau, and M. Lafleur, *Characterization of the diffusion of polyethylene glycol in Streptococcus mutans biofilms by Raman microspectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2004. **58**(11): p. 1295-1301.
172. Sandt, C., et al., *Quantification of local water and biomass in wild type PA01 biofilms by Confocal Raman Microspectroscopy*. Journal of Microbiological Methods, 2008. **75**(1): p. 148-152.
173. Sandt, C., et al., *Quantification of water and biomass in small colony variant PA01 biofilms by confocal Raman microspectroscopy*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **83**(6): p. 1171-1182.
174. Patzold, R., M. Keuntje, and A. Anders-von Ahlften, *A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(2): p. 286-292.
175. Beier, B., R. Quivey, and A. Berger, *Raman microspectroscopy for species identification and mapping within bacterial biofilms*. AMB Express C7 - 35, 2012. **2**(1): p. 1-6.
176. Virdis, B., et al., *Real-Time Measurements of the Redox States of c-Type Cytochromes in Electroactive Biofilms: A Confocal Resonance Raman Microscopy Study*. Plos One, 2014. **9**(2): p. 10.
177. Virdis, B., et al., *Non-invasive characterization of electrochemically active microbial biofilms using confocal Raman microscopy*. Energy & Environmental Science, 2012. **5**(5): p. 7017-7024.
178. Robuschi, L., et al., *Spectroscopic Slicing to Reveal Internal Redox Gradients in Electricity-Producing Biofilms*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **52**(3): p. 925-928.
179. Wagner, M., et al., *Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS - Matrix*. Water Research, 2009. **43**(1): p. 63-76.
180. Wright, C.J., et al., *Application of AFM From Microbial Cell to Biofilm*. Scanning, 2010. **32**(3): p. 134-149.
181. Palmer, R.J. and C. Sternberg, *Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches*. Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(3): p. 263-268.
182. Surman, S.B., et al., *Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms*. Journal of Microbiological Methods, 1996. **25**(1): p. 57-70.
183. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**: p. 930-933.
184. Gaboriaud, F. and Y.F. Dufrene, *Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces*. Colloids and Surfaces B - Biointerfaces, 2007. **54**(1): p. 10-19.
185. Dupres, V., et al., *Microbial nanoscopy: a closer look at microbial cell surfaces*. Trends in Microbiology, 2010. **18**(9): p. 397-405.
186. Touhami, A., M.H. Jericho, and T.J. Beveridge, *Atomic force microscopy of cell growth and division in Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(11): p. 3286-3295.
187. Kailas, L., et al., *Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular purposes*. Ultramicroscopy, 2009. **109**: p. 775-780.

188. Bremer, P.J., G.G. Geesey, and B. Drake, *Atomic force microscopy of the topography of a hydrated bacterial biofilm on a copper surface*. *Current Microbiology*, 1992. **24**(4): p. 223-230.
189. Steele, A., D.T. Goddard, and I.B. Beech, *An atomic-force microscopy study of the biodeterioration of stainless-steel in the presence of bacterial biofilms*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1994. **34**(1): p. 35-46.
190. Mendez-Vilas, A., et al., *Surface characterisation of two strains of Staphylococcus epidermidis with different slime-production by AFM*. *Applied Surface Science*, 2004. **238**(1-4): p. 18-23.
191. Volle, C.B., et al., *Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of Escherichia coli ZK1056 prey cells during predation by Bdellovibrio bacteriovirus 109J*. *Langmuir*, 2008. **24**(15): p. 8102-8110.
192. Volle, C.B., et al., *Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2008. **67**(1): p. 32-40.
193. Pembrey, R.S., K.C. Marshall, and R.P. Schneider, *Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties?* *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. **65**(7): p. 2877-2894.
194. Auerbach, I.D., et al., *Physical morphology and surface properties of unsaturated Pseudomonas putida biofilms*. *Journal of Bacteriology*, 2000. **182**(13): p. 3809-3815.
195. Ahimou, F., et al., *Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. **73**(9): p. 2897-2904.
196. Arce, F.T., et al., *Nanoscale Structural and Mechanical Properties of Nontypeable Haemophilus influenzae Biofilms*. *Journal of Bacteriology*, 2009. **191**(8): p. 2512-2520.
197. Fantner, G.E., et al., *Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy*. *Nat Nano*, 2010. **5**(4): p. 280-285.
198. Hansma, P.K., et al., *High-Speed Atomic Force Microscopy*. *Science*, 2006. **314**(5799): p. 601-602.
199. van Noort, S.J.T., et al., *High speed atomic force microscopy of biomolecules by image tracking*. *Biophysical Journal*, 1999. **77**(4): p. 2295-2303.
200. Polyakov, P., et al., *Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18887.
201. Gaboriaud, F., et al., *Surface structure and nanomechanical properties of Shewanella putrefaciens bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy*. *Journal of Bacteriology*, 2005. **187**(11): p. 3864-3868.
202. Touhami, A., B. Nysten, and Y.F. Dufrêne, *Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy*. *Langmuir*, 2003. **19**(11): p. 4539-4543.
203. Chen, Y.Y., et al., *Surface Rigidity Change of Escherichia coli after Filamentous Bacteriophage Infection*. *Langmuir*, 2009. **25**(8): p. 4607-4614.
204. Ducker, W.A., T.J. Senden, and R.M. Pashley, *Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope*. *Nature*, 1991. **353**(6341): p. 239-241.
205. Larson, I., et al., *Direct force measurements between silica and alumina*. *Langmuir*, 1997. **13**(7): p. 2109-2112.
206. Butt, H.J., *Electrostatic interaction in atomic force microscopy*. *Biophysical Journal*, 1991. **60**(4): p. 777-785.
207. Ahimou, F., et al., *Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy*. *Langmuir*, 2002. **18**(25): p. 9937-9941.

208. Fang, H.H.P., K.Y. Chan, and L.C. Xu, *Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM)*. Journal of Microbiological Methods, 2000. **40**(1): p. 89-97.
209. Oh, Y.J., et al., *Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy*. Ultramicroscopy, 2009. **109**(8): p. 874-880.
210. Chaw, K.C., M. Manimaran, and F.E.H. Tay, *Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in Staphylococcus epidermidis biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(12): p. 4853-4859.
211. Francius, G., et al., *Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria*. ACS Nano, 2008. **2**(9): p. 1921-9.
212. Lebeer, S., et al., *Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long galactose-rich exopolysaccharide in Lactobacillus rhamnosus GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**: p. 3554-3563.
213. El-Kirat-Chatel, S., et al., *Single-Cell and Single-Molecule Analysis Deciphers the Localization, Adhesion, and Mechanics of the Biofilm Adhesin LapA*. ACS Chemical Biology, 2014. **9**(2): p. 485-494.
214. Lower, B.H., et al., *Antibody Recognition Force Microscopy Shows that Outer Membrane Cytochromes OmcA and MtrC Are Expressed on the Exterior Surface of Shewanella oneidensis MR-1*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. **75**(9): p. 2931-2935.
215. McEwen, G.D., Y. Wu, and A. Zhou, *Probing nanostructures of bacterial extracellular polymeric substances versus culture time by Raman microspectroscopy and atomic force microscopy*. Biopolymers. **93**(2): p. 171-177.
216. Pradhan, N., et al., *Micro-Raman analysis and AFM imaging of Acidithiobacillus ferrooxidans biofilm grown on uranium ore*. Research in Microbiology, 2008. **159**(7-8): p. 557-561.
217. Rhodes, M.E., *The characterization of Pseudomonas-fluorescens*. Journal of general microbiology, 1959. **21**(1): p. 221-263.
218. Romeo, T., *Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB*. Molecular Microbiology, 1998. **29**(6): p. 1321-1330.
219. Jackson, D.W., et al., *Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(1): p. 290-301.
220. Carzaniga, T., et al., *The RNA processing enzyme polynucleotide phosphorylase negatively controls biofilm formation by repressing poly-N-acetylglucosamine (PNAG) production in Escherichia coli C*. BMC Microbiology, 2012. **12**.
221. Johnsen, A.R., et al., *Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in Sphingomonas biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3487-3491.
222. Goldstein, I., C. Hollerman, and J.M. Merrick, *Protein-carbohydrate interaction I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1965. **97**(1): p. 68-76.
223. Sumner, J.B., *The globulins of the jack bean, canavalia ensiformis*. Journal of Biological Chemistry, 1919. **37**(1): p. 137-U1.
224. Olson, M.O.J. and I.E. Liener, *Association and dissociation of concanavalin A phytohemagglutinin of jack bean*. Biochemistry, 1967. **6**(12): p. 3801-&.
225. Yariv, J., A.J. Kalb, and A. Levitzki, *Interaction of concanavalin A with methyl alpha-D-glucopyranoside*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1968. **165**(2): p. 303-&.

226. Nagata, Y. and M.M. Burger, *Wheat-germ agglutinin - molecular characteristics and specificity for sugar binding*. Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**(10): p. 3116-3122.
227. Stocks, S.M., *Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight*. Cytometry Part A, 2004. **61A**(2): p. 189-195.
228. Strathmann, M., J. Wingender, and H.C. Flemming, *Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of Pseudomonas aeruginosa* Journal of Microbiological Methods, 2002. **50**: p. 237-248.
229. Humbert, B., et al., *Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge*. Techniques de l'ingénieur Spectrométries, 2012. **base documentaire : TIB390DUO**(ref. article : p2850).
230. Straughan, B.P. and S. Walker, *Spectroscopy*. Vol. 2. 1976, London: Chapman and Hall.
231. Barbillat, J., et al., *Spectrométrie Raman*. Techniques de l'ingénieur CND : méthodes surfaciques, 1999. **base documentaire : TIB586DUO**(ref. article : p2865).
232. Reiter, G., et al., *Interaction of a Bacterial Endotoxin with Different Surfaces Investigated by in Situ Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopy*. Langmuir, 2002. **18**(15): p. 5761-5771.
233. Arakawa, E.T., et al., *Optical properties of horseradish peroxidase from 0.13 to 2.5 mm*. Biospectroscopy, 2008. **3**(1): p. 73-80.
234. Fujita, K., et al., *Raman imaging of alkyne as a small tag for biological molecules*. Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues X, 2012. **8225**.
235. Binnig, G., et al., *Surface studies by scanning tunneling microscopy*. Physical Review Letters, 1982. **49**: p. 57-61.
236. Dufrêne, Y.F., *Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology*. Current Opinion in Microbiology, 2003. **6**(3): p. 317-323.
237. Beech, I.B., *The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms - An overview*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1996. **37**(3-4): p. 141-149.
238. Parot, P., et al., *Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine*. Journal of Molecular Recognition, 2007. **20**(6): p. 418-431.
239. Turner, A.P.F., *Biochemistry - Biosensors sense and sensitivity*. Science, 2000. **290**(5495): p. 1315-1317.
240. Hinterdorfer, P. and Y.F. Dufrêne, *Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy*. Nature Methods, 2006. **3**(5): p. 347-355.
241. Lévy, R. and M. Maaloum, *Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods*. Nanotechnology, 2002. **13**: p. 33-37.
242. Rief, M., et al., *Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1295-1297.
243. Bustamante, C., et al., *Entropic elasticity of Lambda-phage DNA*. Science, 1994. **265**(5178): p. 1599-1600.
244. Lu, X., et al., *Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria*. Food and Bioprocess Technology, 2011. **4**(6): p. 919-935.

245. Maquelin, K., et al., *Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy*. Journal of Microbiological Methods, 2002. **51**(3): p. 255-271.
246. Fuchs, H.D., et al., *Comparison of the phonon-spectra of Ge-70 and natural Ge crystals - effects of isotopic disorder*. Physical Review B, 1991. **43**(6): p. 4835-4842.
247. Lucacel, R.C., C. Marcus, and I. Ardelean, *FTIR and Raman spectroscopic studies of copper doped 2GeO(2)center dot PbO center dot Ag2O glasses*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2007. **9**(3): p. 747-750.
248. Weber, A. and E.A. McGinnis, *The Raman spectrum of gaseous oxygen*. Journal of Molecular Spectroscopy, 1960. **4**(3): p. 195-200.
249. Schie, I.W. and T. Huser, *Methods and Applications of Raman Microspectroscopy to Single-Cell Analysis*. Applied Spectroscopy, 2013. **67**(8): p. 813-828.
250. Notingher, I., *Raman Spectroscopy cell-based Biosensors*. Sensors, 2007. **7**(8): p. 1343-1358.
251. Ivleva, N.P., et al., *Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy*. Anal.Bioanal.Chem., 2009. **393**(1): p. 197-206.
252. Himmelsbach, D.S. and D.E. Akin, *Near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(3): p. 991-998.
253. Barth, A. and C. Zscherp, *What vibrations tell us about proteins*. Quarterly Reviews of Biophysics, 2002. **35**(4): p. 369-430.
254. Tfayli, A., et al., *Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin*. Biopolymers, 2007. **87**(4): p. 261-274.
255. Neugebauer, U., et al., *Towards a detailed understanding of bacterial metabolism - Spectroscopic characterization of Staphylococcus epidermidis*. ChemPhysChem, 2007. **8**: p. 124-137.
256. Edwards, H.G.M., et al., *Fourier transform Raman spectroscopic study of fungi*. Journal of Raman Spectroscopy, 1995. **26**(8 & 9): p. 911-916.
257. Williams, A.C. and H.G.M. Edwards, *Fourier-transform Raman-spectroscopy of bacterial-cell walls*. Journal of Raman Spectroscopy, 1994. **25**(7-8): p. 673-677.
258. Schrader, B., *Applications of Raman spectroscopy in the near-infrared range. Part II*. Chemie in Unserer Zeit, 1997. **31**(6): p. 270-279.
259. Rosch, P., et al., *In situ Raman investigation of single lipid droplets in the water-conducting xylem of four woody plant species*. Biopolymers, 2004. **74**(1-2): p. 151-156.
260. Notingher, I., et al., *Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells*. Biopolymers, 2003. **72**(4): p. 230-240.
261. De Gelder, J., et al., *Reference database of Raman spectra of biological molecules*. Journal of Raman Spectroscopy, 2007. **38**(9): p. 1133-1147.
262. Thonymeyer, L., et al., *Escherichia-coli genes required for cytochrome-c maturation*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(15): p. 4321-4326.
263. Bertini, I., G. Cavallaro, and A. Rosato, *Cytochrome c: Occurrence and functions*. Chemical Reviews, 2006. **106**(1): p. 90-115.
264. Ow, Y.-L.P., et al., *Cytochrome c: functions beyond respiration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 532-542.
265. Lenhoff, H.M. and N.O. Kaplan, *A cytochrome peroxidase from Pseudomonas fluorescens*. Nature, 1953. **172**(4381): p. 730-731.

266. Hu, S., et al., *Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymatic reconstitution with isotopically labeled hemes*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**: p. 12446-12458.
267. Lenhoff, H.M. and N.O. Kaplan, *Cytochrome peroxidase from Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biological Chemistry, 1956. **220**(2): p. 967-982.
268. Ambler, R.P., *Amino acid sequence of Pseudomonas cytochrome c-551*. Biochemical Journal, 1963. **89**(2): p. 349-&.
269. Keilin, D. and C.H. Harpley, *Cytochrome system in Bacterium coli commune*. Biochemical Journal, 1941. **35**: p. 688-692.
270. Al-Qadiri, H.M., et al., *Studying of the bacterial growth phases using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2008. **16**(1): p. 73-89.
271. Sezonov, G., D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari, *Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth*. Journal of Bacteriology, 2007. **189**(23): p. 8746-8749.
272. Escoriza, M.F., et al., *Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2006. **60**(9): p. 971-976.
273. Verrier, S., et al., *In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy*. Biopolymers, 2004. **74**(1-2): p. 157-162.
274. Al-Qadiri, H.M., et al., *Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of Escherichia coli O157 : H7 and Alicyclobacillus strains in apple juice*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **111**(1): p. 73-80.
275. Cao, B., et al., *Extracellular polymeric substances from Shewanella sp HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics*. Environmental Microbiology, 2011. **13**(4): p. 1018-1031.
276. Chen, Y.-P., et al., *Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers*. Chemosphere, 2013. **92**(6): p. 633-638.
277. Le Gal, J.M., M. Manfait, and T. Theophanides, *Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria*. J.Molec.Struct., 1991. **242**: p. 397-407.
278. Naumann, D., *Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR*. Infrared Physics, 1984. **24**(2/3): p. 233-238.
279. Stuart, B., *Biological applications of infrared spectroscopy*. ACOL Series,. 1997, Chichester, UK: Wiley.
280. Filip, Z. and S. Hermann, *An attempt to differentiate Pseudomonas spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy*. European Journal of Soil Biology, 2001. **37**(3): p. 137-143.
281. Walker, S.L., et al., *Influence of Growth Phase on Adhesion Kinetics of Escherichia coli D21g*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(6): p. 3093-3099.
282. Cartling, B., *Intermediate and stable redox states of cytochrome-c studied by low-temperature resonance Raman-spectroscopy*. Biophysical Journal, 1983. **43**(2): p. 191-205.
283. Eng, L.H., et al., *Resonance Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering studies of oxide-reduction of cytochrome c(3)*. Langmuir, 1996. **12**(12): p. 3055-3059.
284. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2008. **1777**(7-8): p. 877-881.
285. Francius, G., et al., *Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy*. Nature Protocols, 2009. **4**(6): p. 939-946.



286. Camesano, T.A. and N.I. Abu-Lail, *Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on a single-molecule basis*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(4): p. 661-667.
287. Haupt, B.J., T.J. Senden, and E.M. Sevick, *AFM evidence of Rayleigh instability in single polymer chains*. *Langmuir*, 2002. **18**(6): p. 2174-2182.
288. Pletikapic, G., et al., *Self-Assembly of Polysaccharides Gives Rise to Distinct Mechanical Signatures in Marine Gels*. *Biophysical Journal*, 2014. **107**(2): p. 355-364.
289. Higgins, M.J., et al., *The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility*. *Journal of Phycology*, 2003. **39**(6): p. 1181-1193.
290. Jacquot, A., et al., *The dynamics and pH-dependence of Ag43 adhesins' self-association probed by atomic force spectroscopy*. *Nanoscale*, 2014. **6**(21): p. 12665-12681.
291. Bentley, S.D., et al., *Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes*. *PLoS Genetics*, 2006. **2**(3): p. 262-269.
292. Landersjo, C., et al., *Structural studies of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC 53103)*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(4): p. 880-884.
293. Kajava, A.V., et al., *Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins*. *Molecular Microbiology*, 2001. **42**(2): p. 279-292.
294. Yoder, M.D., N.T. Keen, and F. Journak, *New domain motif - The structure of pectate lyase-C, a secreted plant virulence factor*. *Science*, 1993. **260**(5113): p. 1503-1507.
295. Ainaravaru, S.R.K., et al., *Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds*. *Biophysical Journal*, 2007. **92**(1): p. 225-33.
296. Tobi, D. and R. Elber, *Distance-dependent, pair potential for protein folding: Results from linear optimization*. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 2000. **41**(1): p. 40-46.
297. Graeter, F., et al., *Dissecting entropic coiling and poor solvent effects in protein collapse*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(35): p. 11578-+.
298. Cooney, C.L., *Growth of microorganisms*, in *Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 volumes. Volume 1. Microbial fundamentals*, H.J. Rehm and G. Reed, Editors. 1981, Verlag Chemie. p. 73-112.
299. Cerca, N. and K.K. Jefferson, *Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*, 2008. **283**(1): p. 36-41.
300. Agladze, K., X. Wang, and T. Romeo, *Spatial periodicity of Escherichia coli K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA*. *Journal of Bacteriology*, 2005. **187**(24): p. 8237-8246.
301. Vournakis, J.N., et al., *Isolation, purification, and characterization of poly-N-acetyl glucosamine use as a hemostatic agent*. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, 2004. **57**(1): p. S2-S6.
302. Dauvillee, D., et al., *Role of the Escherichia coli glgX gene in glycogen metabolism*. *Journal of Bacteriology*, 2005. **187**(4): p. 1465-1473.
303. Preiss, J. and T. Romeo, *Molecular-biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 47, 1994. **47**: p. 299-329.

304. Romeo, T. and J. Preiss, *Genetic regulation of glycogen biosynthesis in Escherichia coli: in vitro effects of cyclic AMP and guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and analysis of in vivo transcripts*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(5): p. 2773-2782.
305. Bansil, R., I.V. Yannas, and H.E. Stanley, *Raman spectroscopy: a structural probe of glycosaminoglycans*. Biochimica et Biophysica Acta, 1978. **541**(4): p. 535-542.
306. Svetlicic, V., et al., *Marine Polysaccharide Networks and Diatoms at the Nanometric Scale*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(10): p. 20064-20078.
307. Zhang, W. and X. Zhang, *Single molecule mechanochemistry of macromolecules*. Progress in Polymer Science, 2003. **28**(8): p. 1271-1295.
308. Xu, Q.B., et al., *Single-molecule force spectroscopy on carrageenan by means of AFM*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. **22**(14): p. 1163-1167.
309. Li, H.B., et al., *Single-molecule force spectroscopy on Xanthan by AFM*. Advanced Materials, 1998. **10**(4): p. 316-319.
310. Li, H., et al., *Force spectroscopy on single xanthan molecules*. Applied Physics a-Materials Science & Processing, 1999. **68**(4): p. 407-410.
311. Zhang, L., et al., *Single-molecule force spectroscopy on curdlan: Unwinding helical structures and random coils*. Nano Letters, 2003. **3**(8): p. 1119-1124.
312. Scherer, A., et al., *Intermolecular interactions of polymer molecules determined by single-molecule force spectroscopy*. Macromolecules, 2005. **38**(23): p. 9821-9825.
313. Lienemann, M., et al., *Characterization of the wheat germ agglutinin binding to self-assembled monolayers of neoglycoconjugates by AFM and SPR*. Glycobiology, 2009. **19**(6): p. 633-643.
314. Jiang, W., et al., *Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy*. Langmuir, 2004. **20**(26): p. 11433-11442.
315. Guerrero, P., J.P. Kerry, and K. de la Caba, *FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends*. Carbohydrate Polymers, 2014. **111**: p. 598-605.
316. Camesano, T.A. and B.E. Logan, *Probing bacterial electrosteric interactions using atomic force microscopy*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(16): p. 3354-3362.
317. Venyaminov, S.Y. and N.N. Kalnin, *Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions .I. spectral parameters of amino-acid residue absorption-bands*. Biopolymers, 1990. **30**(13-14): p. 1243-1257.
318. Pohle, W., et al., *FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds*. Journal of Molecular Structure, 2001. **563-564**(0): p. 463-467.
319. Hübner, W. and A. Blume, *Interactions at the lipid-water interface*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **96**(1-2): p. 99-123.
320. Casal, H.L. and H.H. Mantsch, *Polymorphic phase-behavior of phospholipid-membranes studied by infrared-spectroscopy*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1984. **779**(4): p. 381-401.
321. Pohle, W., *The PO<sub>2</sub><sup>-</sup> moiety - A hydrogen bonding acceptor in biological molecules*. Journal of Molecular Structure, 1990. **219**(0): p. 281-286.
322. Tajmir-Riahi, H.A., et al., *The effect of HCl on the solution structure of calf thymus DNA: A comparative study of DNA denaturation by proton and metal cations using fourier transform IR difference spectroscopy*. Biopolymers, 1995. **35**(5): p. 493-501.
323. Omoike, A. and J. Chorover, *Spectroscopic Study of Extracellular Polymeric Substances from Bacillus subtilis: Aqueous Chemistry and Adsorption Effects*. Macromolecules, 2004. **5**(4): p. 1219-1230.

324. Barja, B.C., J. Herszage, and M.D. Alfonso, *Iron(III)-phosphonate complexes*. Polyhedron, 2001. **20**(15-16): p. 1821-1830.
325. Boulos, L., et al., *LIVE/DEAD<sup>(R)</sup> BacLight<sup>TM</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water*. Journal of Microbiological Methods, 1999. **37**(1): p. 77-86.
326. Abe, Y., et al., *Elasticity and physico-chemical properties during drinking water biofilm formation*. Biofouling, 2011. **27**(7): p. 739-750.
327. Chapman, A.C. and L.E. Thirlwell, *Spectra of phosphorus compounds .I. The infra-red spectra of orthophosphates*. Spectrochimica Acta, 1964. **20**(6): p. 937-947.
328. Ward, W.W., *Properties of the Coelenterate green-fluorescent proteins*. Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical applications. Eds. DeLuca, M. & McElroy, WD (Academic Press, Inc., NY), 1981: p. 235-242.
329. Patterson, G.H., et al., *Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy*. Biophysical Journal, 1997. **73**(5): p. 2782-2790.
330. Campbell, T.N. and F.Y.M. Choy, *The effect of pH on green fluorescent protein: A brief review*. Molecular Biology Today, 2001. **2**(1): p. 1-4.
331. Seo, J.H., D.G. Kang, and H.J. Cha, *Comparison of cellular stress levels and green-fluorescent-protein expression in several Escherichia coli strains*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003. **37**: p. 103-107.

## Résumé

Les biofilms sont des communautés complexes de microorganismes, enchâssées dans une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires ou EPS. Les biofilms se forment à la surface de la plupart des matériaux, qu'ils soient de nature biologique ou non, et sont à l'origine de divers problèmes économiques et sanitaires. Les bactéries dans un biofilm, dites bactéries sessiles, présentent en effet des propriétés phénotypiques qui les distinguent de leurs homologues planctoniques, notamment par une résistance accrue aux antibiotiques et aux traitements de désinfection. D'où, la nécessité de prévenir leur formation et/ ou de leur élimination à partir de stratégies mieux adaptées à ce mode de vie en communauté. Le développement de telles stratégies passe entre autre par une meilleure connaissance des contributions physico-chimiques gouvernant les interactions de ces microorganismes avec leur environnement proche notamment lors des étapes initiales de la formation des biofilms.

Deux grands objectifs ont été fixés au début de cette thèse, le premier visant à caractériser, *in situ* et en temps réel la formation de jeunes biofilms de deux modèles bactériens : une souche naturelle et ubiquitaire de *Pseudomonas fluorescens* et une souche modèle d'*Escherichia coli* obtenue par génie génétique pour surexprimer un seul type d'EPS. Le deuxième objectif de cette thèse, consiste à étudier leurs réponses à un stress environnemental ou chimique, notamment quand les biofilms doivent se développer dans des conditions extrêmes de pH. Pour atteindre ces objectifs, différentes techniques ont été combinées pour étudier de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire le développement des biofilms.

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (FTIR-ATR) a été utilisée pour suivre en temps réel le développement des biofilms. Nous avons pu suivre l'évolution des empreintes spectrales IR-ATR au cours de la formation des biofilms, sous des conditions favorables ou non à leur croissance. De jeunes biofilms de 24 h ont été étudiés par microspectroscopie Raman confocale (MRC), celle ci permettant d'obtenir des informations localisées sur la composition chimique des biofilms. La structure générale des biofilms a été visualisée par la microscopie à épifluorescence. Finalement, les propriétés physico-chimiques des EPS ont été quantifiées par spectroscopie de force atomique à l'échelle de la molécule unique (SMFS pour Single Molecule Force Spectroscopy).

Mots clés : Biofilms, EPS, stress environnemental, FTIR-ATR, microspectroscopie Raman confocale, AFM, SMFS

## Abstract

Biofilms are complex communities of microorganisms, embedded in an auto-produced matrix of extracellular polymeric substances or EPS. Biofilms form on the surface of most materials, whether or not they are of biological nature, and cause major economic problems as well as public health concerns. Bacteria within a biofilm also called sessile bacteria, have phenotypic characteristics that distinguish them from their planktonic counterparts, rendering them more resistant to antibiotics and to disinfection strategies. Hence, the prevention of their formation and/ or their elimination requires the use of strategies that are well suited to the sessile mode of life. The development of these strategies begins with a better understanding of the physicochemical contributions that govern the interaction between the sessile community and its environment especially during the first steps of biofilm formation.

Two main objectives were defined at the beginning of this thesis, the first was to characterize, *in situ*, and in real time the development of nascent biofilms. Two bacterial models were studied: a natural and ubiquitous strain of *Pseudomonas fluorescens* and a model strain of *Escherichia coli* genetically modified to overexpress one type of EPS. The second objective was to study their responses towards an environmental or chemical stress; particularly how their development would be affected under extreme conditions of pH. To gain these objectives, different techniques were combined to study from the molecular to the cellular scale the development of biofilms.

Fourier Transform Infrared spectroscopy in attenuated total reflection mode was used to evaluate in real time the development of biofilms. We were able to detect changes in the IR-ATR spectral profile along biofilm formation under favorable and non favorable growth conditions. 24 h - old biofilms were characterized using confocal Raman microspectroscopy, which allowed us to gather localized information on their chemical composition. The structure of biofilms was visualized using epifluorescence microscopy. Finally, physico-chemical properties of EPS were quantified using single molecule force spectroscopy.

Keywords: biofilms, EPS, environmental stress, FTIR-ATR, confocal Raman microspectroscopy, AFM, SMFS.