

Université de Montréal

Étude de l'effet d'agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms sur la diffusion des macromolécules dans les biofilms de *Streptococcus mutans*: cas de l'EDTA et de l'aspirine

par Doudou Madoda – Nsiambote

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire déposé à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Janvier 2014

© Doudou Madoda - Nsiambote

Résumé

Le but de ce travail de mémoire était d'explorer des moyens pour augmenter la perméabilité des biofilms de *Streptococcus mutans* aux macromolécules en utilisant des agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms. L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) ainsi que l'acide acétylsalicylique (aspirine) sont les agents perturbateurs choisis. Le changement de perméabilité des biofilms de *S. mutans* a été déterminé en mesurant les coefficients de diffusion globale du polyéthylène glycol (PEG) et de diffusion locale de dextrans. Les coefficients de diffusion globale ont été mesurés par spectroscopie infrarouge avec un échantillonnage par réflexion totale atténuée (ATR) alors que la spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF) a été utilisée pour la mesure des coefficients de diffusion locale. Les résultats ont démontré que l'incorporation de l'EDTA à une concentration de 7.5 (m/v) % dans la solution de diffusion permet d'améliorer les propriétés de transport du PEG dans les biofilms en augmentant sa pénétrabilité et son coefficient de diffusion globale. Par contre, aucune variation n'a été constatée dans la valeur du coefficient de diffusion locale de dextran fluorescent. Cette différence peut être expliquée, entre autres, par l'échelle des mesures et la nature différente des molécules diffusantes. L'aspirine n'a démontré aucun effet sur le transport du PEG à travers les biofilms de *S. mutans*. La pénétration accrue du PEG en présence de l'EDTA a été corrélée aux tests de viabilité des cellules bactériennes. En effet, la combinaison de la pénicilline G (PenG) avec l'EDTA 2 (m/v) % a eu comme effet l'augmentation du pouvoir biocide d'un facteur 3. De plus, les images de microscopie à épifluorescence et de microscopie confocale à balayage de laser ont démontré que les bactéries dans le cœur des microcolonies sont plus affectées par la PenG lorsque le milieu contient de l'EDTA.

A la lumière des résultats obtenus, il s'avère que l'incorporation d'agents perturbateurs de la structure des biofilms est une option sérieuse à considérer dans l'éradication des biofilms microbiens. Plus d'études devront être effectuées afin d'investiguer l'effet d'autres molécules possédant les propriétés perturbatrices de la structure des biofilms sur la résistance de ces derniers aux agents antimicrobiens.

Mots-clés : Biofilms de *Streptococcus mutans*, diffusion dans les biofilms, EDTA, aspirine.

Abstract

The aim of this study was to investigate the role of biofilm structure disrupting potential agents in the biofilm permeability to macromolecules.

The effect of ethylenediamine tetraacetic (EDTA) and acetylsalicylic acid (aspirin), two potential disrupting agents, on the diffusion of poly (ethylene glycol) (PEG) and dextran in *Streptococcus mutans* biofilms was investigated. Attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy was used to measure the global diffusion coefficients, while the local diffusion coefficients were measured using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). On one hand, the results showed that EDTA, at a concentration of 7.5 (w/v) %, increased PEG penetrability and global diffusion coefficient in biofilms. No effect was noticed for the local diffusion coefficient of fluorescent dextran molecules. This difference was associated with, amongst others, the scale of the measurements and the different nature of the diffusing species. On the other hand, aspirin had no effect on the *S. mutans* biofilm permeability for PEG. The enhanced penetration of PEG in the presence of EDTA was correlated with bacterial cell viability. The bactericidal effect of penicillin G (PenG) alone and in combination with EDTA, was assessed for the biofilms. The results showed that antibiotic effect of PenG was improved by a factor of 3 when the antibiotic was used in combination with EDTA compared to the same antibiotic used alone. Moreover images obtained by epifluorescence microscopy and laser scanning confocal microscopy indicated that the bacteria in the core of the microcolonies were more affected by PenG when the milieu contained EDTA.

These results revealed that the use of disrupting agents of biofilm structure is a promising approach to eradicate biofilms showing resistance to classical antimicrobial agent treatments. More studies should be done to investigate the effect of others potentials disrupting agents on the biofilm permeability to macromolecules.

Keywords: *Streptococcus mutans* biofilm, biofilm diffusion, EDTA, aspirin.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 Problématique.....	1
1.2. Biofilm	3
1.2.1. Importance.....	3
1.2.2. Mécanisme de formation	3
1.2.3. Substances polymériques extracellulaires (EPS)	5
1.2.4. Facteurs affectant l'adhésion des cellules : les propriétés des surfaces.....	6
1.2.5. Physiologie	8
1.2.6. Résistance aux antibiotiques et aux agents biocides	8
1.3. Éradication des biofilms.....	10
1.4. Streptococcus mutans.....	12
1.5. Diffusion dans les biofilms et coefficient de diffusion	13
1.6. Diffusion globale par IR-ATR.....	16
1.6.1. Principe.....	16
1.6.2. Croissance des biofilms	17
1.6.3. Diffusion et mesure du coefficient de diffusion.....	17
1.6.4. Optimisation de la méthode	19
1.7. Diffusion locale	20
1.7.1. Principe.....	20
1.7.2 Croissance du biofilm et mesures du coefficient d'autodiffusion	20
CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	22
2.1. Diffusion globale	22

2.1.1. Produits chimiques	22
2.1.2 Montage IR	22
2.1.3. Souche bactérienne et milieu de culture	23
2.1.4. Culture des biofilms dans la cellule ATR.....	24
2.1.5. Diffusion du PEG - Effet de l'EDTA et de l'aspirine	24
2.1.6. Acquisition et traitement des spectres	26
2.1.7. Optimisation de la méthode	27
2.2. Diffusion locale	27
2.2.1. Produits chimiques	27
2.2.2. Culture du biofilm et mesures du coefficient de diffusion locale	28
2.2.3. Acquisition des données	28
2.3. Test d'inhibition des biofilms.....	29
2.4. Imagerie par microscopie	30
CHAPITRE 3. RÉSULTATS	31
3.1. Diffusion globale par IR-ATR.....	31
3.1.1. Optimisation de la méthode	31
3.1.2. Diffusion du PEG.....	37
3.1.3. Effet de l'EDTA.....	42
3.1.4. Effet de l'aspirine.....	48
3.2. Diffusion locale par SCF.....	51
3.3. Test de viabilité sur les cellules du biofilm de <i>S. mutans</i>	54
CHAPITRE 4. DISCUSSION.....	61
4.1. Optimisation de la méthode.....	61
4.2. Effet des agents perturbateurs	64
4.2.1. Effet de l'aspirine	64
4.2.2. Effet de l'EDTA	65
CHAPITRE 5. CONCLUSION	71
RÉFÉRENCES	73

Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des valeurs de B, D et de pénétrabilité obtenues lors de la diffusion du PEG dans le biofilm de <i>S. mutans</i> avec celles de la littérature.	42
Tableau 2: Effet de l'EDTA sur les propriétés de diffusion du PEG dans le biofilm de <i>S. mutans</i>	46
Tableau 3: Effet de l'aspirine sur les paramètres de diffusion du PEG dans les biofilms*.	51
Tableau 4: Pourcentage de viabilité des cellules du biofilm de <i>S. mutans</i> (par rapport au contrôle) en fonction de la concentration d'EDTA.	54
Tableau 5: Pourcentage de viabilité des cellules du biofilm (par rapport au contrôle) de <i>S. mutans</i> traités avec les solutions d'EDTA et de PenG.	55

Liste des figures

- Figure 1 : Modèle proposant les interactions intermoléculaires contribuant à la stabilité mécanique des biofilms. (1) Interactions électrostatiques répulsives entre ions de charges identiques (2) forces électrostatiques attractives en présence des cations bivalents (3) liaisons hydrogène (4) interactions dipôle – dipôle (5) interactions de London.6
- Figure 2: Image obtenue par microscopie confocale à balayage de laser des bactéries de *Rhodotorula glutinis* après 24 h de croissance (Roberts *et al.*, 1999). On y observe la présence des cellules bactériennes dans les irrégularités de la surface.7
- Figure 3: Représentation schématique du module réflexion totale atténuée (IR-ATR) (Marcotte *et al.*, 2000). λ représente la longueur d'onde, n les indices de réfraction, d_p la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. 16
- Figure 4 : Schéma du montage ATR (Marcotte, 2000). A : contrôleur de température, B : l'inoculum, C : la solution de diffusion, D : le substrat frais, E : thermocouple, F : mousse synthétique isolante, G : chambre de la cellule, H : cristal de ZnSe, I : éléments chauffants, J : vase à déchets, K : pompe péristaltique.23
- Figure 5 : Spectre infrarouge brut du biofilm de *S. mutans*. ν = élongation, d = déformation. .31
- Figure 6 : Augmentation de l'aire de la bande C-O des polysaccharides lors de la croissance du biofilm après 10, 11, 13, 15, 17 et 19 heures de croissance. 32
- Figure 7 : Croissance du biofilm cultivé sur un cristal traité et non traité au plasma, telle que décrite par l'aire de la bande d'élongation de C-O des sucres de la matrice d'exopolysaccharides. 33
- Figure 8 : Vue de dessus de la cellule ATR. Le biofilm y apparait sous forme de film blanc sur fond jaune (cristal ATR). Le cristal ZnSe a été préalablement nettoyé au plasma (A) et à l'éthanol uniquement (B). L'image (B) démontre que l'absence du nettoyage au plasma a une influence sur l'adhésion des biofilms à la surface du cristal ZnSe. 34

Figure 9 : Influence du débit sur la croissance du biofilm telle qu'observée à partir de l'aire de la bande d'élongation du lien C-O des sucres formant la matrice d'exopolysaccharides. 35

Figure 10 : Aire normalisée (par rapport à la valeur la plus élevée) de la bande d'élongation du lien C-O des sucres formant la matrice d'exopolysaccharides des biofilms en fonction du temps et sous deux différentes conditions de débit. 35

Figure 11 : Influence du débit sur la couverture de cristal ZnSe par le biofilm. A et B représentent la vue du dessus (A) et du dessous (B) du cristalensemencé avec un débit de 0.5 ml/min pendant 25 h. C représente le cristalensemencé avec un débit de 0.3 ml/min pendant 20 h. 36

Figure 12 : Mise en relief de la bande de phosphate vers 990 cm^{-1} dans le spectre du PEG. Comparaison avec le spectre du PEG de référence et celui du PBS. L'apparition de cette bande confirme le remplacement du milieu de culture par la solution PBS. Les spectres de différence sont obtenus de la soustraction du spectre du biofilm du spectre enregistré après la diffusion du PEG (biofilm + PEG). 38

Figure 13 : Cinétique de pénétration de PBS caractérisée à partir de la variation en fonction du temps, de l'intensité de la bande vers 990 cm^{-1} due à la vibration du groupement phosphate. . 39

Figure 14 : Cinétique de pénétration du D_2O et du PEG. Intensité en fonction du temps de la bande d'élongation O-D associée au HOD vers 2500 cm^{-1} et de C-O du PEG vers 1085 cm^{-1} . Le temps $t = 0$ est égal à t_a (arrivée de la solution dans la cellule ATR, voir figure 15). 40

Figure 15: Chronologie d'entrée des liquides dans la cellule ATR. $t_a = t_0$ utilisé pour les présentations des cinétiques de pénétration, $t_a + 30\text{ s}$: temps pour lequel on obtient 10% de l'intensité de la bande d'élongation OD associée à HOD dans le spectre, $t_a + 60\text{ s}$: temps généralement utilisé comme t_0 dans les simulations des cinétiques, $t_a + 90\text{ s}$: temps pour lequel on obtient 70% de l'intensité de la bande d'élongation OD associée à HOD dans le spectre. 40

Figure 16 : Mise en relief de la contribution du PEG. De haut en bas: 1) spectre du biofilm après 60 minutes de diffusion de la solution contenant le PEG 2) spectre de référence du biofilm 3) spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 1-2. 4) spectre de référence du PEG 2k. 41

Figure 17 : Cinétique de pénétration du PEG caractérisé à l'aide de l'aire de la bande C-O du PEG en fonction du temps. Le temps t_0 correspond à $t_a + 30$ s.	42
Figure 18 : Lavage du biofilm par une solution de PBS. La concentration de PEG à l'interface est estimée par la hauteur de la bande d'élongation C-O à 1085 cm^{-1}	43
Figure 19 : Mise en relief de la contribution du PEG en présence de l'EDTA. De haut en bas : 1) spectre du biofilm après 60 minutes de diffusion de la solution contenant le PEG + EDTA 2) Spectre de référence du biofilm 3) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 1-2. 4) Spectre de référence de l'EDTA 5) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 3-4. 6) Spectre de référence du PEG.	44
Figure 20 : Croissance de la bande associée à l'élongation du groupe carboxylate de l'EDTA vers 1402 cm^{-1} après 1.4, 1.9, 2.4, 2.9, 3.4 et 3.9 minutes de diffusion.	44
Figure 21 : Cinétique de pénétration de l'EDTA, du HOD ainsi que du PEG à l'intérieur d'un biofilm de <i>S. mutans</i> . Le temps $t = 0$ correspond à t_a (arrivée de la solution dans la cellule ATR). L'aire est normalisée à 1 par rapport à la valeur la plus élevée.	45
Figure 22 : Mise en évidence de l'effet de l'EDTA sur la pénétration du PEG 2k par comparaison de l'aire sous la bande d'absorption du lien C-O du PEG diffusant seul et en présence de l'EDTA dans le biofilm de <i>S. mutans</i>	46
Figure 23 : Mise en évidence de l'effet de l'EDTA dans la vitesse de pénétration du PEG 2k par comparaison de l'aire normalisée sous la bande d'absorption du lien C-O du PEG 2k diffusant seul et en présence de l'EDTA dans le biofilm de <i>S. mutans</i> . L'aire est normalisée à 1 par rapport à la valeur la plus élevée.	46
Figure 24 : Spectre du biofilm A) avant la diffusion du PEG+EDTA et B) après la diffusion du PEG+EDTA.	47
Figure 25 : Apparition de la bande à 1200 cm^{-1} associée à l'élongation du lien C-O de l'ester suite à la diffusion de l'aspirine à travers le biofilm après 0, 2.0, 2.5, 3.0 et 3.5 minutes.	49

Figure 26 : Mise en évidence de la contribution du PEG en présence de l'aspirine. 1) Spectre de diffusion après 60 minutes de diffusion du PEG avec l'aspirine. 2) Spectre du biofilm avant la diffusion. 3) Spectre de différence résultant de la soustraction de spectre 1 moins 2 = spectre du PEG + aspirine. 4) Spectre de l'aspirine. 5) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 3 moins 4 = spectre du PEG. 6) Spectre de référence du PEG. 49

Figure 27 : Cinétique de pénétration de l'aspirine, du HOD ainsi que du PEG dans un biofilm de *S. mutans*. Le temps $t = 0$ correspond au temps t_a (le temps d'arrivée de la solution dans la cellule ATR). 50

Figure 28 : Étude de l'effet de l'aspirine dans la cinétique de pénétration du PEG à travers le biofilm. Le temps $t = 0$ est désigné par t_0 , qui correspond à $t_a + 30$ secondes. La première cinétique (PEG_1) représente l'expérience de diffusion du PEG seul. La cinétique PEG + aspirine représente celle obtenue lors de la diffusion du PEG en présence d'aspirine. La cinétique PEG_2 est obtenue lors de la 3^{ème} diffusion du PEG après que le biofilm ait été laissé en contact avec l'aspirine pendant 80 h. Les cinétiques sont obtenues sur le même biofilm. ... 51

Figure 29: Coefficient de diffusion locale du dextran 10k en fonction du pourcentage de l'EDTA. 53

Figure 30: Coefficient de diffusion locale relatif du dextran 10k dans les biofilms de *S. mutans* en fonction du pourcentage de l'EDTA. 53

Figure 31 : Compte viable (en pourcentage) des cellules du biofilm de *S. mutans* traité avec les trois groupes de solutions. Les cercles représentent chacune des observations expérimentales, les diagrammes ou boîtes à moustaches représentées par les rectangles donnent une idée sur la dispersion des données obtenues dans deux conditions de concentration en cellules bactériennes (soit 10^6 et 10^7 CFU/ml) pour chaque groupe et la barre horizontale représente la médiane. ... 56

Figure 32 : Images du biofilm de *S. mutans* obtenues avec le test de coloration par microscopie à épifluorescence avec un microscope optique. (A) biofilm soumis au traitement à 125 °C dans l'autoclave, (B) biofilm traité avec la solution contrôle, PBS à pH 7.0, (C) biofilm traité avec l'EDTA 2 (m/v) %, (D) biofilm traité avec la solution de PenG 25 g/L, (E) biofilm traité avec la solution de PenG + EDTA. Les images ont été obtenues avec un objectif de grossissement 1000x. 58

Figure 33 : Images du biofilm de *S. mutans* obtenu par microscopie confocale à balayage de laser. (A) biofilm traité uniquement avec l'EDTA 2 (m/v) %, (B) biofilm traité avec la solution de PenG 25 g/L, (C) biofilm traité avec la solution de PenG + EDTA.....60

Liste des sigles et des abréviations

AHL	Acyl homosérine lactone
ANOVA	Analysis of variance (analyse des variances)
IR-ATR	Infrared-Attenuated total reflection (réflexion totale atténuée)
B	Taux de pénétration
<i>CA</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	Colony forming units
CMI	Concentration minimale inhibitrice
<i>D</i>	Coefficient de diffusion globale
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EPS	Extracellular polymeric substances
GTF	Glycosyl transferase
MDR	Multidrug resistance
<i>PA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Tampon phosphate (phosphate buffer)
PEG	Polyéthylène glycol
PenG	Pénicilline G
<i>t₀</i>	Temps du début de la diffusion
<i>t_a</i>	Temps d'arrivée des solutions dans la cellule ATR
TBO	Toluidine blue O
<i>t_d</i>	Temps de départ de la pompe
TYE	Trypticase yeast extract

Remerciements

Je rends grâce à Dieu pour le souffle de vie et la santé qu'il m'accordés tout au long de ma vie ainsi que durant toute la période de ma maîtrise.

J'adresse un remerciement spécial à ma mère qui, d'une seule main, m'a permis d'avoir accès à une éducation de qualité. Je remercie également ma grande sœur Denise Kuyena Nzuzi à qui je dois mon arrivée au Canada.

Je voudrai exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de recherche Michel Lafleur pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce projet. Mes remerciements sont également adressés à toute son équipe de recherche pour le bon climat de collaboration et d'amitié qui y a régné tout au long de mon projet de maîtrise. Je remercierai spécialement Marc-André Gagnon pour son encadrement et le support tant technique que scientifique. Mes remerciements sont également adressés au professeur Jean Barbeau, co-directeur de ce projet de maîtrise, car la formation en microbiologie que j'ai reçue auprès de son équipe a été une valeur ajoutée très significative dans mon cursus scientifique. Je me sens extrêmement chanceux d'avoir bénéficié de ce privilège. Je voudrai à cet effet exprimer une reconnaissance spéciale envers Annie Leduc, technicienne de laboratoire de microbiologie, qui a été non seulement une bonne formatrice, mais encore une amie et confidente extraordinaire. Merci à Daniel, Jasmin ainsi qu'à toute l'équipe de Jean Barbeau pour m'avoir aussi bien accueilli parmi eux. Un grand merci également à Pierre Rompre pour sa contribution dans l'interprétation statistique de mes résultats. Enfin je voudrai exprimer ma reconnaissance au Professeur Kevin J. Wilkinson et à son étudiant en post doctorat Zeshi Zhang pour leur contribution à la partie SCF de mon projet.

A tous les membres de ma famille, à mes proches et amis qui m'ont soutenu de quelque façon que ce soit, je tiens à exprimer toute l'expression de ma reconnaissance.

Merci à tous.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Problématique

Il est aujourd'hui bien connu que les microorganismes possèdent deux formes d'organisation. Ils peuvent vivre sous une forme planctonique, forme sous laquelle ces cellules vivent individuellement ou, organisés sous forme de biofilm. Dans les biofilms, les cellules microbiennes sont organisées en microcolonies encapsulées dans une matrice de polysaccharides et de protéines (EPS pour *extracellular polymeric substances*) également appelée glycocalyx. Sous cette forme, elles adhèrent entre elles et à une surface. Les biofilms possèdent une importance du point de vue médical et industriel due à une plus grande tolérance aux antibiotiques et autres traitements biocides par rapport aux cellules planctoniques (Costerton *et al.*, 1999a; Evans *et al.*, 1991). Leur résistance aux agents antimicrobiens peut être 10 – 1000 fois plus élevée comparée à la forme planctonique (Nickel *et al.*, 1985; Evans et Holmes, 1987; Prosser *et al.*, 1987; Gristina *et al.*, 1987). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la diminution de la sensibilité des microorganismes présents dans les biofilms aux agents antimicrobiens; parmi celles-ci, on retrouve une limitation de la pénétration des agents biocides dans les biofilms, réduisant la dose effective à l'endroit des bactéries.

Notre équipe de recherche a déjà démontré que la diffusion de macromolécules à l'intérieur d'un biofilm de *Streptococcus mutans* est ralentie par rapport à la forme libre en milieu aqueux (Marcotte *et al.*, 2004). L'approche adoptée dans notre étude était donc basée sur l'hypothèse selon laquelle la matrice des EPS constituerait une barrière physique limitant le déplacement des macromolécules à l'intérieur des biofilms. Dans cette optique, l'utilisation d'agents perturbateurs de la structure des EPS a été envisagée dans le but d'améliorer les propriétés de transport des macromolécules dans le biofilm de *S. mutans*. Deux agents potentiellement perturbateurs ont été choisis dans ce but, soit l'acide acétylsalicylique (aspirine) et l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). Il a été rapporté que l'aspirine possède la propriété de causer une modification de structure du biofilm de *Candida albicans* (CA) (Alem et Douglas,

2004). Il a été démontré dans cette étude que, lorsqu'observé par microscopie confocale à balayage, le biofilm de *C. albicans* traité avec une solution de 1 mM d'aspirine possède une structure plus ridée par rapport au biofilm contrôle (en l'absence de l'aspirine). Cette propriété de l'aspirine sera exploitée sur le biofilm de *S. mutans* dans le but d'améliorer la diffusion de macromolécules à travers ce biofilm. Quant à l'EDTA, son choix repose sur l'hypothèse suggérant la participation des ions divalents, comme le calcium, dans la gélification de la matrice d'exopolysaccharides (Hoyle *et al.*, 1992; Marquis, 1968; Allison et Matthews, 1992). Dans ce cas, l'EDTA, reconnu pour complexer les ions divalents, pourrait causer une perturbation de la structure des biofilms et améliorer ainsi leur perméabilité.

Pour étudier l'effet de ces agents potentiellement perturbateurs sur les propriétés de transport d'antibiotiques, les diffusions du PEG 2k et du dextran 10k dans les biofilms de *S. mutans* ont été caractérisées. Les propriétés de diffusion de ces macromolécules qui ont été mesurées sont le taux de pénétration (B), le coefficient de diffusion (D) ainsi que la pénétrabilité ou pourcentage de pénétration dans le biofilm (exprimée en termes de la concentration des macromolécules dans le biofilm par rapport à celle de la solution réservoir au-dessus du biofilm). Le coefficient de diffusion a été mesuré par deux techniques. D'abord la spectroscopie infrarouge, utilisant la réflexion totale atténuée (IR-ATR) comme méthode d'échantillonnage, a servi à la mesure du coefficient de diffusion globale. Ensuite le coefficient de diffusion locale du dextran a été mesuré par spectroscopie par corrélation de fluorescence. La comparaison entre les propriétés de diffusion dans les biofilms « intacts » et dans les biofilms ayant été en contact avec les agents perturbateurs a permis de mettre en évidence les effets de ces derniers sur la perméabilité des biofilms. Des mesures de viabilité des cellules bactériennes du biofilm ont été effectuées en parallèle pour déterminer l'impact de l'utilisation des agents perturbateurs de structure des biofilms dans le traitement de ceux-ci.

1.2. Biofilm

1.2.1. Importance

La résistance des biofilms aux antibiotiques, aux agents biocides ainsi qu'aux désinfectants leur confère une importance médicale et économique. Au point de vue médical, ils sont associés à la majorité des infections chroniques (Costerton, 1997), aux problèmes de contaminations d'implants (ex. prothèses) et d'équipements médicaux (ex. cathéters) ainsi qu'à certaines infections de tissus mous (pharynx nasal, bouche, etc.) et de surfaces dures (dents et muscles) (Costerton *et al.*, 1987, Spach *et al.*, 1993, Griffiths *et al.*, 1997). Dans les industries agro-alimentaires, les biofilms peuvent coloniser les surfaces qui sont en contact avec les aliments et causer ainsi la contamination et la détérioration des produits (Holah *et al.*, 1994, Eginton *et al.*, 1998). Il existe de ce fait un besoin de développer des traitements biocides qui soient efficaces contre les cellules microbiennes vivant au sein des biofilms.

1.2.2. Mécanisme de formation

La formation des biofilms sur un support solide se fait en une séquence de plusieurs étapes.

1.2.2.1. Adsorption réversible

L'adsorption réversible est le phénomène d'adhésion des cellules sur la surface. Elle est facilitée par des récepteurs membranaires appelés adhésines (Konkel *et al.*, 1997) et est régie par des interactions faibles telles que les interactions électrostatiques et les forces de van der Waals (vanLoodsdrecht *et al.*, 1990). A cette étape de la formation du biofilm, les cellules peuvent être détachées sous l'influence des facteurs chimiques, biologiques ou physiques. Plusieurs facteurs influencent l'adsorption cellulaire dont les propriétés de la surface et du milieu de croissance ainsi que le type de microorganisme (Taylor *et al.*, 1997).

1.2.2.2. Adsorption irréversible

L'adhésion irréversible est caractérisée par des interactions intercellulaires et la production de polymères extracellulaires. L'adhésion des cellules devient stable et se traduit par le développement de microcolonies (Prakash *et al.*, 2003). Une structure tridimensionnelle commence à se mettre en place et les cellules commencent à s'échanger des signaux chimiques (O'Toole *et al.*, 2000; Bechmann et Eduvean, 2006).

1.2.2.3. Croissance

La croissance est l'étape durant laquelle le biofilm colonise la surface solide et forme des macrocolonies. Lorsque la densité de cellules microbiennes devient suffisamment élevée, il s'en suit une cascade de réactions appelée *quorum sensing* conduisant à la production des gènes responsables de la production des exopolymères formant le glycocalyx (Allison et Sutherland, 1987; Davies *et al.*, 1998). Durant cette étape, les cellules s'adaptent aux différents facteurs environnementaux du milieu dans lequel se développe le biofilm (Kjelleberg et Molin, 2002). Le *quorum sensing* (en français traduit par la perception du quorum) est le phénomène par lequel certaines espèces bactériennes échangent des signaux chimiques par la production des molécules appelées auto-inducteurs. C'est une forme de communication intercellulaire par laquelle les cellules microbiennes d'une communauté contrôlent et synchronisent certaines fonctions physiologiques. Lorsque l'affinité entre les cellules bactériennes planctoniques et le support est faible, il est difficile d'atteindre la densité nécessaire afin de produire suffisamment des signaux chimiques conduisant au déclenchement de la production du biofilm. Lorsque la densité des cellules devient élevée (lorsque le quorum est atteint), la concentration des auto-inducteurs augmente, activant ainsi l'expression des gènes responsables de la synthèse des polymères extracellulaires et de l'adhésion des cellules à la surface. Le *quorum sensing* joue donc un rôle important lors de cette étape car il permet aux cellules de s'échanger des informations à propos de leur densité en vue de déclencher le processus de production des EPS utile à l'adhésion et la formation des biofilms (Sutherland, 1999).

1.2.2.4. Dispersion

Suite à certains facteurs de stress environnementaux ou encore au vieillissement du biofilm, certaines cellules microbiennes ou certains morceaux du biofilm peuvent se détacher. Ils peuvent retrouver ainsi la forme planctonique ou encore aller coloniser d'autres surfaces solides et déclencher la formation d'autres biofilms.

1.2.3. Substances polymériques extracellulaires (EPS)

Les EPS sont des polymères biologiques et constituent le matériau de construction des biofilms. Ils contribuent à certaines de leurs propriétés biologiques, biochimiques ainsi que physico-chimiques (Sutherland, 1999). Les EPS sont majoritairement constitués de polysaccharides et de protéines, mais peuvent contenir en faible quantité d'autres macromolécules telles que l'ADN et des lipides (Costerton *et al.*, 1999a; Sihorkar et Vyas, 2001; Allison, 2003). Les polysaccharides des EPS sont majoritairement composés d'exopolysaccharides contenant 5 (D-ribose) ou 6 atomes de carbone (D-glucose, D-galactose et D-mannose) ainsi que d'acides uroniques. Chez les *Streptococcus*, on retrouve comme polysaccharides majoritaires, les homopolymères de glucanes du type dextrans et les homopolymères de fructanes du type levane. Quant aux protéines, il existe très peu de données concernant leur nature, mais il a été rapporté que chez les bactéries dentaires, la majorité des protéines des EPS sont des enzymes impliquées dans la synthèse des exopolysaccharides (Welin *et al.*, 2004). Les propriétés physico-chimiques de la matrice des EPS sont d'une importance capitale car elles sont responsables de la cohésion des microorganismes au sein du biofilm ainsi que de l'adhésion des biofilms sur une surface solide. La force d'adhésion dépend de la composition chimique ainsi que de la structure tertiaire des EPS (Costerton *et al.*, 1985). La stabilité qu'ils confèrent au biofilm est le résultat de diverses interactions schématisées dans la figure 1, parmi lesquelles on trouve les forces de London, des liens hydrogène ainsi que des interactions électrostatiques.

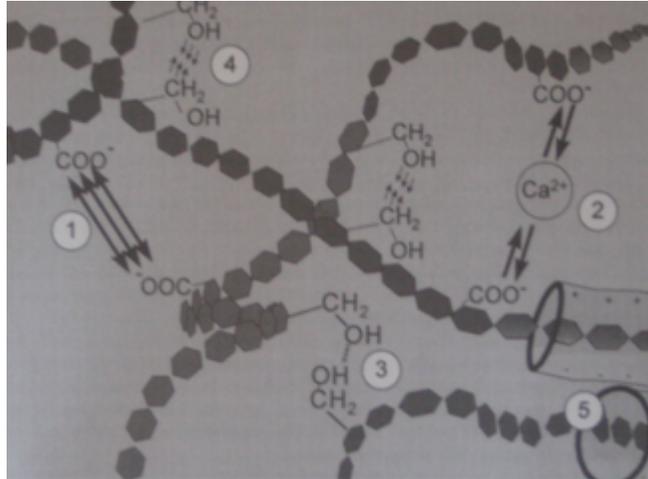


Figure 1 : Modèle proposant les interactions intermoléculaires contribuant à la stabilité mécanique des biofilms. (1) Interactions électrostatiques répulsives entre ions de charges identiques (2) forces électrostatiques attractives en présence des cations bivalents (3) liaisons hydrogène (4) interactions dipôle – dipôle (5) interactions de London.

La présence des cations divalents dans les biofilms contribue à l'amélioration de leur cohésion en servant de ponts entre des charges négatives de molécules des EPS et participent à la stabilité des biofilms. Il a été proposé que les cations divalents favorisent la formation de gels et augmentent la rigidité de ces matrices (Allison et Matthews, 1992). Les principaux cations divalents qui contribuent à assurer la structure des biofilms sont le Cu^{2+} , le Ca^{2+} et le Fe^{2+} (Allison et Matthews, 1992). Hoyle *et al.* (1992) ont démontré que le calcium possédait la propriété d'augmenter la consistance de la matrice d'EPS en la rendant plus condensée. Dans le même ordre d'idée, Marquis (1968) a rapporté que l'ajout de calcium causait une diminution de la diffusion de molécules au sein de la matrice d'EPS. Cette propriété pourrait s'expliquer par le fait que le calcium favoriserait la formation de gel de la matrice des EPS en contribuant à la formation d'une structure tridimensionnelle entre les polymères des polysaccharides (Allison et Matthews, 1992).

1.2.4. Facteurs affectant l'adhésion des cellules : les propriétés des surfaces

Il a été rapporté qu'au début de la formation des biofilms, le taux d'attachement des bactéries à la surface dépend des propriétés physiques de celle-ci (Hissett *et al.*, 1995). La propriété physique qui est la plus étudiée et qui a démontré le plus d'influence sur la formation des biofilms est la rugosité de la surface. La croissance des biofilms mixtes de deux espèces de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* et le *P. putida*) sur quatre surfaces de rugosités différentes (l'acier, le chlorure de polyvinyle, le laiton et le verre) a permis de conclure que le taux de croissance des biofilms varie de façon proportionnelle à la rugosité de surface (Brading, 1996). Cette relation a également été notée lors de la comparaison des biofilms sur une surface de laiton sablé et de laiton non sablé. Cette observation souligne l'importance du traitement préalable du support sur lequel le biofilm doit se développer. L'obtention d'un taux de croissance plus élevé des biofilms sur la surface plus rugueuse s'explique par le fait que la rugosité offre une plus grande surface de croissance aux cellules microbiennes (Mueller *et al.*, 1992). De plus, une surface rugueuse offrirait aux colonies microbiennes une protection contre les forces de cisaillement (figure 2) (Quirynen, 1994). Ce phénomène a été évoqué comme la raison pour laquelle les bactéries formant la plaque supra et sous gingivale commencent leur attachement dans les irrégularités et les fissures des dents (Roberts *et al.*, 1999).

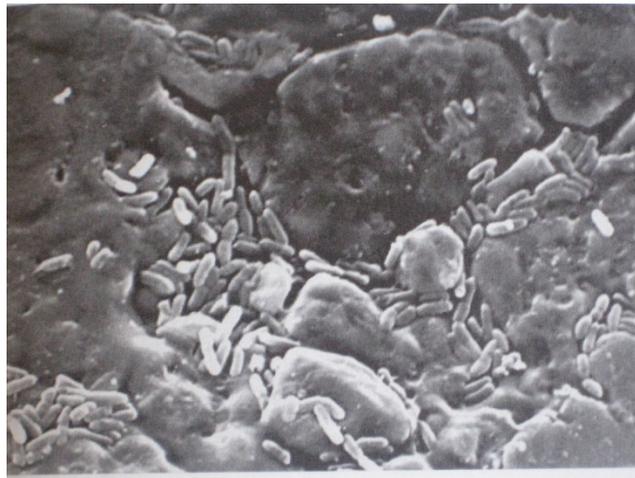


Figure 2: Image obtenue par microscopie confocale à balayage de laser des bactéries de *Rhodotorula glutinis* après 24 h de croissance (Roberts *et al.*, 1999). On y observe la présence des cellules bactériennes dans les irrégularités de la surface.

1.2.5. Physiologie

Les biofilms peuvent présenter des propriétés physico-chimiques différentes suivant les conditions de croissance. Au sein d'un même biofilm, il existe une certaine hétérogénéité structurale et chimique selon la région du biofilm considérée. En effet, il existe à l'intérieur du biofilm un gradient de la disponibilité des nutriments et de la facilité d'élimination des produits de métabolisme. De plus, le taux de croissance des cellules microbiennes se trouvant dans la région périphérique du biofilm (à l'interface biofilm/liquide) diffère de celui des cellules se trouvant plus au centre du biofilm (Allison et Gilbert, 1995); les cellules se trouvant dans le cœur du biofilm ont une faible accessibilité aux nutriments, ce qui cause un taux de croissance plus faible que celui des cellules périphériques. Ce gradient s'accroît au fur et à mesure que le biofilm atteint de la maturité (Zambrano et Colter, 1995) et se traduit même par une différence de phénotype au sein de la même communauté biofilmique. Ce phénomène a comme conséquence une différence dans la sensibilité face aux agents biocides selon la région du biofilm considérée (Gilbert et Allison, 1999). Les conditions physico-chimiques de l'environnement dans lequel le biofilm se développe ont également une influence sur la structure de celui-ci. En présence des forces de cisaillement, le biofilm présente une structure compacte et la matrice d'exopolysaccharides montre une texture filiforme (March, 1995; Stoodley *et al.*, 1999). Par contre, dans les conditions statiques, les forces de cisaillement sont faibles. Dans ces conditions, les biofilms font face à une carence de nutriments car le milieu de culture n'est pas renouvelé. Comme conséquence, les biofilms présentent une structure qui maximise le contact avec le substrat pour palier à la rareté de nutriments rencontrée dans les milieux statiques (Costerton *et al.*, 1994).

1.2.6. Résistance aux antibiotiques et aux agents biocides

Plusieurs études ont examiné les mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques et aux agents biocides. Plusieurs hypothèses ont été proposées et la majorité d'entre elles associe la résistance des biofilms à la présence de la matrice extracellulaire. Cette dernière contribuerait à

la diminution de la sensibilité des microorganismes présents dans le biofilm de différentes façons. Il a été rapporté que la matrice extracellulaire affecte la diffusion des molécules antimicrobiennes en jouant le rôle d'un tamis et constituant ainsi une barrière physique limitant le transport de ces molécules au sein du biofilm (Costerton, 1977; Slack et Nichols, 1981; Costerton et Marriert, 1983; Bryers et Drummond, 1998; Costerton *et al.*, 1999a). Cette barrière physique empêcherait ainsi les antibiotiques et autres agents biocides d'atteindre les cellules microbiennes. Certains auteurs rapportent que la diffusion limitée des antibiotiques à l'intérieur des biofilms n'est pas uniquement l'effet de la barrière physique. La diminution du taux de diffusion dans les biofilms serait aussi la conséquence d'interactions entre l'agent biocide et des constituants de la matrice des EPS (Suci *et al.*, 1994) comme, par exemple, des interactions électrostatiques où la matrice agirait comme une résine échangeuse d'ions, et où les molécules chargées seraient retenues (Slack et Nichols, 1981 et 1982; Suci *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1987). Des réactions chimiques (généralement les réactions d'oxydation) entre les exopolymères et les agents antimicrobiens sont aussi évoquées. Dans ce cas, au lieu d'attaquer leurs cibles, c'est-à-dire les cellules microbiennes, les agents biocides réagissent avec les polymères des EPS, ce qui a comme conséquence de modifier leur structure et de diminuer leur efficacité (Favero *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1998). La résistance serait également associée à des réactions catalytiques par les enzymes présentes dans la matrice d'EPS, inactivant ainsi les agents antimicrobiens (Hoyle *et al.*, 1992; de Beer *et al.*, 1994a). Parmi les enzymes potentiellement impliquées, on trouve la β -lactamase (Giwerzman, 1991), la formaldéhyde lyase, la formaldéhyde déshydrogénase (Sondossi *et al.*, 1985) et la catalase (Cochran *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2000).

D'autres auteurs suggèrent que le phénomène de résistance est attribuable à des changements physiologiques intervenant durant le processus de formation des biofilms (Dunne *et al.*, 1993) ou encore à la diminution du taux de croissance des bactéries au cœur de la matrice d'EPS, ce qui les rendrait moins susceptibles à certains antibiotiques (Tuomanen *et al.*, 1986a; Tuomanen *et al.*, 1986b; Brown *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1991; Duguid *et al.*, 1992a; Duguid *et al.*, 1992b; Wentland *et al.*, 1996). De plus, ces mécanismes peuvent avoir comme conséquence une exposition de cellules microbiennes à des concentrations d'antibiotique inférieures à des concentrations inhibitrices. L'exposition des cellules à ces concentrations favoriserait

l'induction de phénotypes plus résistants et augmenterait la résistance à long terme de ces microorganismes (Gilbert et Allison, 1999, George et Levy, 1983; Levy, 1992; Ma *et al.*, 1993).

1.3. Éradication des biofilms

A cause de leur résistance, l'éradication des biofilms présente un défi de taille. Plusieurs études de traitements *in vitro* ainsi que d'essais précliniques sur les animaux ont été réalisées afin d'investiguer l'efficacité de diverses méthodes pour l'éradication des biofilms. Plusieurs de ces études ont été réalisées sur les biofilms de bactéries responsables d'infections des oreilles, du nez ou de la gorge. Par exemple, on trouve dans ce groupe *Haemophilus influenzae*, responsable de l'otite (Erlich *et al.*, 2002), *Staphylococcus aureus*, associé à la rhino-sinusite chronique (Brook, 2005), et *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de plusieurs infections dont certaines rhino-sinusites. Les différents traitements étudiés consistent en l'emploi d'antibiotiques et d'agents antimicrobiens non-antibiotiques comme les surfactants, les peptides salivaires et les bactéries probiotiques. D'autres types de traitements, telle que la perturbation physique de la structure des biofilms, ont également été testés (Le *et al.*, 2008; Desrosiers *et al.*, 2007). En général, les antibiotiques, lorsqu'utilisés seuls et dans les concentrations avoisinant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des formes planctoniques, sont inefficaces dans la plupart des traitements destinés à éradiquer les biofilms. Les meilleurs résultats s'obtiennent avec des concentrations allant jusqu'à 1000 fois celles des CMI (Desrosiers *et al.*, 2007).

Afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de certains agents, la combinaison d'antibiotiques ou d'un antibiotique avec une autre substance inhibant le mécanisme de résistance des biofilms peut être utilisée. Par exemple, la combinaison de rifampine et de minocycline est un des traitements les plus efficaces pour éradiquer les biofilms à la surface de cathéters (Darouiche *et al.*, 1999; Raad et Hanna, 1999; Spencer, 1999; Woo *et al.*, 2000). Parmi ce type d'approche, on trouve aussi une combinaison d'un antibiotique avec un inhibiteur des gènes de résistance. Par exemple, des traitements peuvent combiner le β -lactame et l'inhibiteur de la β -lactamase ou encore un antibiotique avec un inhibiteur de MDR (famille des gènes responsables de la

résistance cellulaire à un large spectre des médicaments) (Markham *et al.*, 1999; Renau *et al.*, 1999; Stermitz *et al.*, 2000). Des mélanges d'agents antiseptiques comme la chlorhexidine avec le chlorure de cétypyridinium et le triclosan sont employés avec succès dans les rinces buches pour contrôler la formation de la plaque dentaire, un biofilm commun (Foster *et al.*, 2004).

Afin d'augmenter le potentiel antibiotique de certains agents, le traitement combinant la perturbation physique de la structure des biofilms avec un antibiotique a aussi été étudié. Par exemple, l'application de la mupirocine, un surfactant, combinée avec l'illumination avec un laser pulsé a éliminé 99% des biofilms colonisant les sinus de moutons (Le *et al.*, 2008). De manière similaire, la combinaison d'un surfactant et le lavage par jet augmente l'efficacité d'élimination des biofilms par rapport à celle obtenue par simple trempage dans une solution de surfactant (Desrosiers *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2008). D'autres études vont dans ce sens en combinant la thérapie par antibiotique avec une méthode physique de perturbation des biofilms, soit par effet du courant électrique (McLeod *et al.*, 1999), soit par l'ultrason (Rediske *et al.*, 2000). Les différentes recherches citées plus haut suggèrent que les antibiotiques, moins efficaces dans l'éradication des biofilms que pour les bactéries planctoniques, gagnent à être combinés avec des techniques de perturbation physique de la structure des biofilms (Smith *et al.*, 2011). Ces traitements sont recommandables à la fois pour prévenir la formation des biofilms que pour l'éradication des biofilms préformés.

Une autre approche qui retient beaucoup l'attention dans la lutte contre la résistance aux traitements antibactériens des biofilms est le traitement photodynamique (Takarada *et al.*, 2004). Ce traitement consiste à introduire une molécule photosensible dans les biofilms et à l'exciter à l'aide d'une lumière dont la longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'absorbance maximale. L'excitation de la dite molécule génère de molécules oxygénées réactives et toxiques pour les cellules bactériennes (Dougherty *et al.*, 1998). Ce type de traitement s'avère approprié pour les biofilms bactériens car il peut être très localisé et la structure des biofilms permet l'accumulation de molécules photosensibles à proximité des bactéries (Löe, 2000). L'érythromycine (Metcalf *et al.*, 2006), la toluidine blue O (TBO) (Zanin *et al.*, 2005) ainsi que la chlorine (Metcalf *et al.*, 2006) sont parmi les molécules les plus employées comme molécules photosensibles dans ce type de traitement et leur application s'est avérée efficace dans

l'éradication des biofilms de *S. mutans*. Par contre ces traitements photodynamiques présentent certaines limitations. Ils sont généralement moins actifs contre les cellules bactériennes dans les biofilms matures que dans les jeunes biofilms. En plus, il a été démontré que l'efficacité de ce type de traitement est généralement localisée dans les régions périphériques du biofilm ou dans les régions du biofilm les moins denses en bactéries (Fekrazad *et al.*, 2011).

1.4. Streptococcus mutans

S. mutans est une bactérie Gram-positive qui se retrouve dans la plaque dentaire et qui est communément désignée comme responsable de la carie (Cross *et al.*, 2007); cette bactérie présente donc un intérêt médical puisqu'une bonne connaissance de ce biofilm qu'est la plaque dentaire est importante pour améliorer la prévention de la carie dentaire (Loesche, 1986; Barbeau, 1993; Nisengard et Newman, 1994). Les constituants principaux de la membrane cellulaire de *S. mutans* sont les glucanes, qui sont des homo-polysaccharides complexes et neutres composés d'unités α -D-glycopyranose (Cerning, 1990). Il a été rapporté que la première étape dans la colonisation d'une surface par les biofilms fait intervenir les interactions cellule – surface; les interactions cellule – cellule interviennent en deuxième lieu dans l'accroissement du biofilm (O'Toole *et al.*, 2000). Les glucanes étant les constituants principaux de la membrane cellulaire, ces polymères jouent donc un rôle majeur dans la colonisation des surfaces contaminées, dans la formation des biofilms et de ce fait dans la virulence de *S. mutans*; ils sont à la base de l'initiation des phénomènes de formation des biofilms, qui aboutissent à l'augmentation de la résistance de ces microorganismes aux traitements conventionnels (Loesche, 1986). Les glycosyl transférases (GTFs) ont été identifiés comme les enzymes responsables de la production des glucanes en présence de sucrose (Jenkinson et Lamont, 1997). La production des glucanes dans les biofilms des streptocoques est une caractéristique qui différencie les biofilms de ces bactéries de ceux des autres espèces bactériennes (Sutherland, 1999). Ces polysaccharides sont composés de liens α -1,6 et α -1,3-D-glycopyranose; les glucanes sécrétés par *S. mutans* sont composés à 87% de liens α -1,3 et 13% de liens α -1,6. Ces deux types de liens dans les glucanes mènent à des solubilités différentes. La forme α -1,3-D-

glycopyranose est insoluble dans l'eau et est responsable, en partie, de la virulence des biofilms de *S. mutans* chez l'animal (Guggenheim *et al.*, 1972) et l'humain (Keltrup et Funder-Nielsen, 1972). La forme α -1,6, par contre, est soluble dans l'eau, et sa contribution à la virulence de *S. mutans* semble plus grande chez l'animal que chez l'humain (Guggenheim *et al.*, 1972).

1.5. Diffusion dans les biofilms et coefficient de diffusion

La diffusion est un processus qui caractérise le transfert de masse au sein des biofilms (de Beer *et al.*, 1994b). Ce transfert de masse peut être caractérisé par deux types de diffusion, soit la diffusion globale et la diffusion locale. Ces deux types de transport se différencient par les phénomènes physicochimiques qui les régissent ainsi que les échelles spatiales et temporelles dans lesquelles elles se déroulent. La diffusion globale est un phénomène de transport caractérisé par l'existence d'un gradient de concentration des solutés. Elle permet de moyenniser les fluctuations locales de la composition chimique du milieu hétérogène dans lequel se déroule le phénomène de diffusion. Les échelles spatiales et temporelles sont de l'ordre de plusieurs dizaines de micromètres et d'heures. La diffusion locale est quant à elle associée aux mouvements browniens des solutés dans un volume restreint de l'ordre de micromètres. Dans ce cas, l'échelle de temps est de l'ordre de millisecondes.

Diverses techniques directes ont été utilisées pour mesurer le coefficient de diffusion dans les biofilms. Le coefficient de diffusion locale a été mesuré à l'aide des méthodes *in situ* utilisant des techniques de microscopie telle que la microscopie de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour *fluorescence recovery after photobleaching*) (Axelrod *et al.*, 1976; Blonk *et al.*, 1993; Luby-Phelps *et al.*, 1988; Peters et Schloz, 1990). Le FRAP consiste à blanchir une zone restreinte (environ $10 \mu\text{m}^2$) du biofilm possédant une concentration homogène (système à l'équilibre) de molécules fluorescentes. Le blanchiment est effectué avec un faisceau lumineux (photoblanchiment) en exposant le biofilm pendant une courte durée avec un laser. Il en résulte alors une atténuation de la fluorescence dans la zone blanchie qui est entourée des molécules fluorescentes. Le mouvement de ces molécules fluorescentes vers la

zone blanchie permet le retour de la fluorescence dans cette zone. L'analyse de la vitesse de récupération de la fluorescence permet de déterminer le coefficient de diffusion locale du fluorophore grâce à une simulation de l'intensité de fluorescence de la zone blanchie en fonction du temps suivant le photoblanchiment. D'autres auteurs ont eu recours à la microscopie confocale à balayage de laser (MCBL) (Caldwell *et al.*, 1992a; Caldwell *et al.*, 1992b; Lawrence *et al.*, 1991). La MCBL est une technique de microscopie qui permet d'étudier des structures à trois dimensions suite à une reconstitution d'images provenant des sections optiques à deux dimensions dans les plans confocaux. En résumé, le biofilm préalablement marqué par les fluorophores est illuminé par un rayon laser, et il s'ensuit une émission de photons de fluorescence provenant des différents plans de l'échantillon. Grâce à un diaphragme, seuls les photons émis à partir du plan ciblé du biofilm sont détectés, permettant d'obtenir une image de cette tranche. Une autre technique microscopique connue pour mesurer le coefficient de diffusion locale est la microscopie par corrélation de fluorescence (SCF) (Fatin-Rouge et Buffle, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Le principe de SCF est décrit en détails dans la littérature (Fatin-Rouge et Buffle, 2007) et consiste à mesurer à l'état d'équilibre les fluctuations d'intensité de fluorescence des sondes fluorophores dans un petit volume confocal ($1 \mu\text{m}^3$ par exemple) au cours du temps. La diffusion des molécules à l'intérieur et à l'extérieur du volume confocal produit une fluctuation de l'intensité de fluorescence détectée au cours du temps. En absence de réactions chimiques, ces fluctuations sont attribuées aux mouvements de translation de la sonde sur une échelle de temps entre 10^{-7} à $>10^2$ s. A l'aide d'une fonction d'autocorrélation ou de corrélation temporelle de l'intensité de fluorescence, le temps de diffusion ainsi que le coefficient de diffusion locale sont calculés (Maiti *et al.*, 1997; Brock *et al.*, 1998; Rigler et Elson, 2001; Eigen et Rigker, 1994).

Le coefficient de diffusion globale a été mesuré avec les techniques telle que la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Beuling *et al.*, 1998; Vogt *et al.*, 2000; Wieland *et al.*, 2001). La RMN est une technique *in situ* qui fait intervenir un gradient de champ pulsé (pulsed-field gradient en anglais) pour suivre les propriétés des spins magnétiques nucléaires de certains noyaux atomiques (principalement ^1H) comme traceurs (Stejskal et Tanner, 1965). Le principe consiste à mesurer l'atténuation du signal des atomes d'hydrogène des molécules d'intérêt dans le biofilm sous l'effet de leur diffusion. Le coefficient de diffusion est alors calculé à partir

d'une équation mathématique qui relie les intensités des signaux RMN en fonction du temps d'application du gradient de champ magnétique.

D'autres études rapportent l'utilisation de techniques faisant intervenir des microélectrodes pour mesurer le coefficient de diffusion dans les biofilms. Dans ces techniques, les microélectrodes sensibles à la molécule diffusante permettent de mesurer la différence de concentration de l'analyte entre deux régions du biofilm et de déterminer ainsi son coefficient de diffusion après un calibrage des microélectrodes sur un système artificiel possédant une valeur connue du coefficient de diffusion (Bishop *et al.*, 1995).

La méthode spectrométrique par infrarouge utilisant le principe ATR comme mode d'échantillonnage (IR-ATR) s'est avérée une méthode fiable pour mesurer le coefficient de diffusion globale dans les biofilms (Suci *et al.*, 1998; Landa *et al.*, 1999; Marcotte *et al.*, 2004). La spectroscopie infrarouge est une technique de caractérisation qui permet d'analyser les fonctions chimiques des molécules à travers les vibrations de leurs liaisons chimiques. L'ATR est une technique d'échantillonnage infrarouge par réflexion. Dans cette technique, un faisceau infrarouge est envoyé à un certain angle dans un cristal possédant un indice de réfraction élevé (figure 3). Le faisceau est réfléchi à l'intérieur du cristal jusqu'à sa sortie du côté opposé pour être ensuite capté par le détecteur. A chaque point de réflexion, il se crée une onde appelée onde évanescente, qui se propage à la surface du cristal, à une distance variant de 0.5 – 5 μm . Lorsqu'un échantillon est placé en contact avec la surface du cristal, l'onde évanescente est atténuée suite à une absorption par l'échantillon dans la région du spectre infrarouge. Il s'en suit alors une diminution de l'intensité du faisceau détecté, d'où l'appellation de la réflectance totale atténuée (attenuated total reflectance). Pour qu'une réflexion puisse se produire à l'intérieur du cristal, certaines conditions doivent être respectées. Parmi celles-ci, l'indice de réfraction du cristal doit être supérieur à celui de l'échantillon. En plus, l'angle d'incidence du faisceau doit être supérieur à l'angle critique. Les cristaux ATR les plus employés sont le séléniure de zinc (ZnSe) et le germanium (Ge).

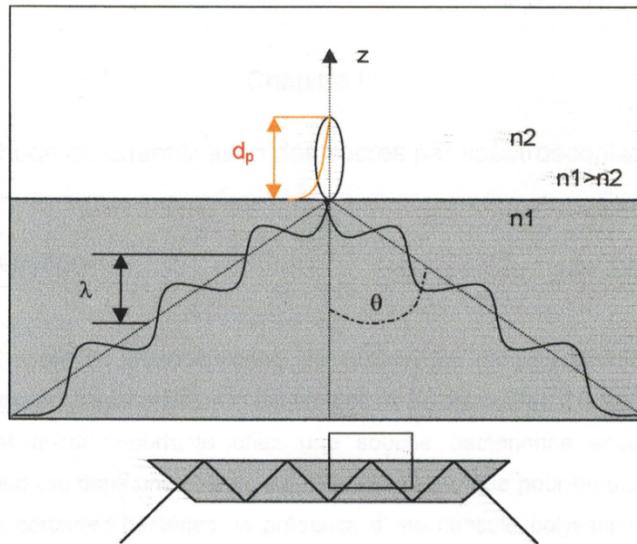


Figure 3: Représentation schématique du module réflexion totale atténuée (IR-ATR) (Marcotte *et al.*, 2000). λ représente la longueur d'onde, n les indices de réfraction, d_p la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

1.6. Diffusion globale par IR-ATR

1.6.1. Principe

La méthode de détermination du coefficient de diffusion globale par IR-ATR a été développée par Suci *et al.* (1998) et reproduite avec succès par Marcotte *et al.* (2000). Le principe de cette méthode consiste à faire pousser un biofilm bactérien à la surface d'un cristal ATR, de faire diffuser au-dessus de ce film une solution d'analyte à concentration constante et d'enregistrer le spectre IR par ATR afin de déterminer l'évolution de la concentration d'analyte dans la zone balayée par l'onde évanescente ou, autrement dit, à l'interface biofilm/solide, à partir de l'absorbance de bandes IR associées à l'analyte. La croissance du biofilm ainsi que la diffusion de l'analyte sont réalisées dans un système de turbulences, c'est-à-dire un système dynamique où l'inoculum ainsi que le milieu de culture servant de nourriture aux cellules bactériennes sont en constant renouvellement.

1.6.2. Croissance des biofilms

La croissance des biofilms dans la cellule ATR se réalise en trois étapes. Dans un premier lieu, il y a introduction de l'inoculum constitué des bactéries en suspension dans un milieu liquide avec un débit constant dans la cellule ATR. Le but de cette étape est de permettre aux cellules bactériennes d'adhérer à la surface du cristal ATR. L'étape de l'inoculation est suivie de celle de croissance par l'introduction de milieu de culture frais et stérile dans la cellule ATR afin de permettre aux cellules attachées au cristal de commencer la production des EPS. C'est l'étape de formation du biofilm proprement dit. La formation du biofilm est suivie en enregistrant les spectres infrarouges où se retrouvent des vibrations des principaux constituants des bactéries et des EPS dont les protéines, l'ARN/ADN et les polysaccharides. Dans notre cas, la croissance des biofilms a été suivie en dressant le profil d'absorption de la bande C-O des polysaccharides dans la zone évanescente en fonction du temps. Lorsque toute la zone évanescente est colonisée par les biofilms, il s'ensuit un arrêt de la croissance des bandes infrarouges. C'est l'étape dite de plateau. Lors de nos expériences, le milieu de culture à la fin de la croissance a été remplacé par le tampon PBS afin d'arrêter la croissance des biofilms en épaisseur (croissance verticale).

1.6.3. Diffusion et mesure du coefficient de diffusion

La diffusion de l'analyte s'effectue dans un système dynamique où la solution au-dessus du biofilm est renouvelée avec un débit stable afin de garder la concentration de l'analyte au-dessus du biofilm constante. L'analyse des bandes caractéristiques de l'analyte des spectres IR permet de déterminer l'évolution de sa concentration dans la région du biofilm près du cristal. Quoique l'épaisseur du biofilm à la fin de la croissance soit d'une centaine de micromètres, les spectres IR enregistrés ne décrivent que les espèces chimiques dans la zone évanescente, c'est-à-dire à environ 2 μm de l'interface biofilm - cristal. Le spectre du biofilm avant le début de la diffusion sert de spectre de référence. Aussi longtemps que la molécule diffusante n'atteint pas la zone évanescente, aucun changement dans le spectre de référence (ou spectre du biofilm) n'est enregistré. Lorsque la molécule arrive dans la zone évanescente, son spectre IR est enregistré et

s'additionne à celui du spectre de référence pour donner un spectre de diffusion. La soustraction entre le spectre de diffusion et celui de référence permet de mettre en évidence le spectre de l'analyte. La concentration de l'analyte à la base du biofilm est déterminée à partir de l'absorbance intégrée de ses bandes caractéristiques. Plus la molécule s'accumule dans la zone évanescente, plus la surface de sa bande d'absorption augmente.

Certes, les biofilms sont des milieux hétérogènes et les modèles mathématiques décrivant la diffusion à l'intérieur de ceux-ci devraient refléter la complexité de leur structure, en tenant compte, par exemple, de l'obstruction stérique des bactéries (Birmingham *et al.*, 1995) et en introduisant des paramètres liés à la porosité et la tortuosité dans les biofilms (Axelrod *et al.*, 1976; Blonk *et al.*, 1993; Birmingham *et al.*, 1995, de Beer *et al.*, 1997). Cependant, dans la présente étude, un modèle simple a été utilisé; celui-ci considère le biofilm comme un film mince, homogène et d'épaisseur uniforme. Le coefficient de diffusion globale est calculé à partir du modèle mathématique décrit par Crank (1975). Dans ce modèle, la diffusion est décrite par un coefficient de diffusion unique (Tatevossian, 1979; Lawrence *et al.*, 1994; Birmingham *et al.*, 1995). Ce modèle utilise une simulation de l'intensité de la bande d'absorption en fonction du temps afin de déterminer le taux de pénétration de l'analyte (équation 1):

$$I(t) = I_{\infty} \left[1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{4(-1)^i}{\pi(2i+1)} \exp[-(2i+1)^2] Bt \right] \quad \text{Équation 1}$$

Dans cette équation, $I(t)$ est l'aire de la bande de l'analyte mesurée au temps t et I_{∞} , celle au temps $t = \infty$. « i » indique qu'il s'agit d'une série de termes (allant de 0 à l'infini) et dans notre cas, nous n'avons considéré dans les simulations uniquement que les quatre premiers termes de la série (soit les valeurs de $i = 0$ à 3), les autres n'influençant pas de manière significative la valeur de l'aire. B représente le taux de pénétration dans le biofilm et est relié au coefficient de diffusion D par la relation suivante (Crank, 1975) :

$$B = \frac{D\pi^2}{4l^2} \quad \text{Équation 2}$$

où l représente l'épaisseur du biofilm et D , le coefficient de diffusion globale.

La pénétrabilité ou le pourcentage de pénétration de l'analyte à la surface biofilm/cristal est calculée en faisant le rapport de l'aire de la bande associée au PEG à la fin de la diffusion (donc au temps $t = \infty$) dans le biofilm avec celle mesurée dans l'eau en absence des biofilms.

Pour mettre en évidence l'effet des agents perturbateurs, la diffusion de l'analyte seul dans le biofilm est d'abord mesurée, le biofilm est alors rincé afin d'éliminer l'analyte, puis la diffusion de l'analyte cette fois en présence de l'agent perturbateur étudié est caractérisée dans le même biofilm. Les bandes spectrales des agents perturbateurs sont soustraites du spectre final afin de s'assurer de conserver uniquement les contributions de l'analyte. La comparaison entre les coefficients de diffusion de l'analyte en absence et en présence de l'agent perturbateur permet alors d'évaluer l'effet de ce dernier sur la diffusion de l'analyte au sein du biofilm.

1.6.4. Optimisation de la méthode

Les propriétés de surface étant un paramètre important dans la croissance des biofilms, le traitement du cristal s'est avéré être une étape importante dans le développement des biofilms à la surface du cristal ATR car l'adhérence des biofilms dépend en grande partie de la rugosité de la dite surface (Brading, 1996). Dans la littérature, il est suggéré de nettoyer le cristal avec une solution d'éthanol 70% avant de faire croître les biofilms (Marcotte *et al.*, 2006). De manière alternative, d'autres groupes ont traité le cristal avec un plasma (Ohno *et al.*, 1998a). Dans le souci d'optimiser la croissance des biofilms sur le cristal ZnSe, ce paramètre a été varié afin de maximiser l'adhérence des biofilms sur le cristal. Pour ce faire, les biofilms ont été cultivés sur le cristal nettoyé uniquement avec une solution éthanolique ainsi que sur un cristal ayant subi un traitement supplémentaire au plasma à l'air. Aussi, vu l'influence des turbulences (conditions statiques ou dynamiques) du milieu dans lequel se développe le biofilm sur la physiologie des bactéries, le débit de circulation des liquides à l'intérieur de la cellule ATR a été étudié. Deux différents débits, soit 0.5 et 0.3 ml/min, ont été étudiés. La valeur de 0.5 ml/min a été choisie

car c'est le débit utilisé durant les expériences faites précédemment (Marcotte *et al.*, 2004) alors que 0.3 ml/min est le débit le plus faible que la pompe péristaltique pouvait nous donner avec une stabilité acceptable.

1.7. Diffusion locale

1.7.1. Principe

La spectroscopie à corrélation de fluorescence est la technique qui a été utilisée pour déterminer le coefficient d'autodiffusion (diffusion locale) dans le biofilm de *S. mutans*. Le principe de cette méthode consiste à mesurer à l'état d'équilibre les fluctuations d'intensité de fluorescence d'un fluorophore dans un volume confocal au cours du temps (Elson et Magde, 1974) afin de déterminer son coefficient de diffusion locale (Fatin-Rouge et Buffle, 2007). La comparaison des mesures effectuées en présence et en absence de l'agent potentiellement perturbateur permet d'évaluer l'effet de ce dernier sur le coefficient d'autodiffusion de l'analyte.

1.7.2 Croissance du biofilm et mesures du coefficient d'autodiffusion

Le biofilm est cultivé dans l'obscurité dans les conditions statiques en inoculant le milieu de culture TYE contenant une culture primaire de *S. mutans*. A la fin de la croissance, tout le milieu de culture est remplacé par la solution contenant le fluorophore. Comme l'autodiffusion locale est due aux mouvements de translation aléatoires de l'analyte et non à ceux associés à un gradient de concentration comme c'est le cas pour la diffusion globale, il est important de laisser suffisamment du temps pour que le système puisse s'équilibrer (15 minutes dans notre cas) avant de commencer les mesures par SCF. Le coefficient de diffusion est calculé suite à une simulation de la fréquence et l'intensité des fluctuations en fonction du temps à partir d'une fonction d'autocorrélation ou de corrélation temporelle de l'intensité de fluorescence ($G(t)$) (équation 3).

Cette fonction décrit une distribution gaussienne à trois dimensions et permet de déterminer le temps de diffusion (τ_D) dans le volume confocal (équation 3).

$$G(t) = a + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\left(\frac{\omega_o}{Z_o}\right)^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad \text{Équation 3}$$

Dans l'équation 3, a est une constante due aux changements de concentration de l'analyte ou aux mouvements du biofilm, N est le nombre moyen des particules fluorescentes dans le volume confocal, τ_D (s) représente le temps de diffusion, t (s) est le temps de retardation, ω_o et Z_o sont les rayons transversal et longitudinal du volume confocal. Dans notre cas, les valeurs de ω_o et Z_o ont été déterminées par un ajustement multiparamétrique des données obtenues par étalonnage du système avec cinq concentrations de la rhodamine 110 dans l'eau, qui a un coefficient de diffusion connu de $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Le temps de diffusion τ_D obtenu en simulant les points expérimentaux à partir de l'équation 3 est relié au coefficient de diffusion locale D par la relation décrite par l'équation 4.

$$D = \frac{\omega_o^2}{4\tau_D} \quad \text{Équation 4}$$

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Diffusion globale

2.1.1. Produits chimiques

Le milieu de culture Trypticase Yeast Extract (TYE) a été préparé avec 5.1 g de trypticase peptone (BBL, Cockeysville, MD, USA), 0.9 g d'extrait de levure (BBL, Cockeysville, MD, USA), 1.5 g de NaCl (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) et 0.75 g de Na₂HPO₄ (A&C, Montréal, QC, Canada) dans un volume total de 300 ml d'eau ultra pure. Le PEG, l'acide acétylsalicylique (aspirine) ainsi que l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) provenaient de chez Sigma (St. Louis, MO, USA). La masse molaire du PEG 2k a été déterminée par spectrométrie de masse par Marc André Gagnon du groupe Lafleur.

2.1.2 Montage IR

L'appareil utilisé pour l'acquisition des spectres infrarouges est un spectromètre Nicolet 4700A couplé avec le module ATR de modèle Horizon de Harrick Scientific Corporation (Ossining, NY, USA). Les biofilms ont été cultivés sur un cristal de sélénure de zinc (ZnSe) en forme de prisme à face trapézoïdale avec un angle d'entrée de 45°. L'indice de réfraction du cristal est de 2.4 (à une longueur d'onde de 10.6 µm) et le nombre de réflexion à la surface où croît le biofilm est 4. Le cristal était monté dans une cellule ATR à flot faite en acier inoxydable. La figure 4 illustre les différents composants du montage expérimental. L'orifice d'entrée était relié aux différentes solutions à faire circuler dans le système (B, C, D) à l'aide de tubes en tygon. La circulation des fluides était assurée par une pompe péristaltique (K) (Masterflex, model 7013-20) à la sortie de la cellule qui aspire donc les liquides. Cette approche minimise la formation de bulles d'air dans la cellule. Le chauffage était assuré par deux éléments chauffants de 35 watts insérés dans le couvercle de la cellule ATR et le contrôle de la température était effectué par un

appareil fait par l'atelier du département de chimie de l'Université de Montréal (A). Un thermocouple inséré dans le couvercle assurait la lecture de la température.

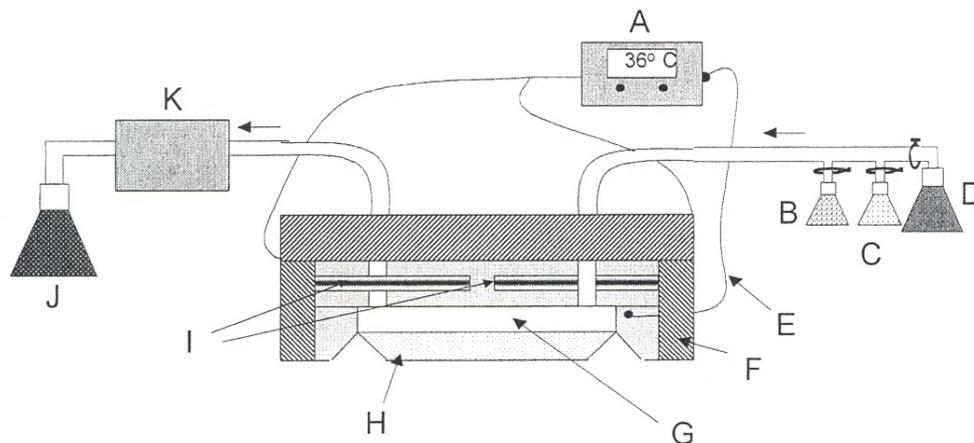


Figure 4 : Schéma du montage ATR (Marcotte, 2000). A : contrôleur de température, B : l'inoculum, C : la solution de diffusion, D : le substrat frais, E : thermocouple, F : mousse synthétique isolante, G : chambre de la cellule, H : cristal de ZnSe, I : éléments chauffants, J : vase à déchets, K : pompe péristaltique.

2.1.3. Souche bactérienne et milieu de culture

La souche de *Streptococcus mutans* NCTC 10449 provenait de la réserve du laboratoire de Jean Barbeau de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal. Cette souche était conservée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans du milieu liquide TYE stérile contenant 0.2 (m/v) % de glucose et 15% de glycérol. 10 ml du milieu de culture stérile TYE contenant 0.2 (m/v) % de glucose étaient inoculés avec 35 μl de la souche conservée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et incubés pendant 24 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ceci a constitué la culture primaire. Ensuite, 300 ml du milieu TYE contenant 0.5 (m/v) % sucrose ont été inoculés avec 2 ml de la culture primaire et incubés pendant 20 h dans un bain chauffant à $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation à 125 rpm. La durée de l'incubation était fixée de façon à obtenir une culture bactérienne possédant une densité optique entre 0.4 - 0.5 à 660 nm. Ceci correspond au début de la phase de plateau dans la courbe de croissance de *S. mutans* (Marcotte *et al.*, 2004). La culture obtenue a constitué l'inoculum et a servi à ensemercer la cellule ATR lors de la culture du biofilm.

2.1.4. Culture des biofilms dans la cellule ATR

Le protocole expérimental choisi pour cette expérience est similaire à celui développé dans la littérature (Suci *et al.*, 1998; Landa *et al.*, 1999) et repris dans notre équipe de recherche par Marcotte (2004). Au cours du présent travail, le débit d'entrée des solutions dans la cellule ATR a été réajusté à 0.3 ml/min au lieu de 0.5 ml/min, comme utilisé dans Marcotte (2004). Les tubes en tygon ont d'abord été stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes et raccordés au montage dans un champ stérile. La cellule ATR a été purgée pendant 5 minutes avec de l'air sec tout juste avant le raccordement des tubes. Le montage expérimental (comprenant la cellule ATR ainsi que les tubes de Tygon) a ensuite été désinfecté pendant une heure avec une solution aqueuse d'éthanol à 70%. A la fin de la désinfection, le système a été rincé avec de l'eau stérilisée ultra pure pendant 30 minutes. L'élimination de l'éthanol était suivie par la disparition des bandes associées aux vibrations des liens C-O dans le spectre IR. Pendant le rinçage, la température était réglée à 36 ± 1 °C. Une fois le rinçage terminé, la cellule ATR a étéensemencée avec l'inoculum à un débit de 0.3 ml/min pendant 5 heures (étape d'inoculation). Il était important de laisser l'inoculum au repos pendant plusieurs minutes (minimum 30 minutes ou jusqu'à ce que tous les agrégats précipitent au fond de la bouteille et que la solution devienne limpide) avant son introduction dans la cellule ATR afin d'inoculer uniquement avec le surnageant et de laisser les agrégats au fond de la bouteille. L'introduction d'agrégats dans la cellule pouvait provoquer la formation de biofilms non homogènes à la surface du cristal ATR. L'étape de l'inoculation était immédiatement suivie par celle de la croissance des biofilms, avec l'entrée du milieu TYE frais et stérile contenant 0.5% de sucrose pendant 15 heures à un débit de 3 ml/min.

2.1.5. Diffusion du PEG - Effet de l'EDTA et de l'aspirine

Bien que le protocole utilisé ici soit similaire à celui trouvé dans la littérature, une modification significative a été introduite. Tout de suite après l'étape de la croissance, une solution tampon PBS à pH 7.2 a été introduite dans la cellule afin de chasser le substrat TYE (milieu de culture

pour les bactéries). Le remplacement s'est fait à un débit de 0.5 ml/min pendant 30 minutes et a été suivi en dressant un profil de l'augmentation de l'intensité de la bande correspondant aux vibrations phosphates vers 990 cm^{-1} . A la fin de la période de lavage au PBS, un spectre du biofilm a été enregistré, juste avant le début de la diffusion du PEG; ce spectre a servi de référence. La solution de PEG 2k 3 (m/v) % contenant 1 (v/v) % de D₂O et préparée dans le tampon PBS a été ensuite introduite dans la cellule ATR. Au début de chaque diffusion, le débit a été augmenté à 10 ml/min pendant 2 minutes afin d'atteindre le plus rapidement possible une concentration constante du PEG dans la cellule. Des tests ont permis de conclure que l'augmentation du débit n'affecte pas l'intégrité des biofilms à la surface du cristal (Marcotte *et al.*, 2004). Le remplacement du PBS par la solution de PEG était observé par l'apparition de l'absorption de l'élongation du lien O-D vers 2500 cm^{-1} . Une fois la hauteur de cette bande constante, le débit a été ramené à 0.5 ml/min et la solution de PEG était pompée dans la cellule pendant 60 minutes. La concentration de PEG près du cristal a été obtenue à partir de l'aire de la bande d'élongation C-O vers 1085 cm^{-1} et cette bande a été intégrée entre 1180 et 1045 cm^{-1} . Le profil de l'intensité de cette bande en fonction du temps a permis de suivre la diffusion du PEG. A la fin de la période de diffusion, la solution de PEG a été éliminée en effectuant un lavage de la cellule avec le tampon PBS. Le lavage était considéré comme complété lorsque la bande associée aux vibrations des liens C-O du PEG vers 1085 cm^{-1} (correspondant au pic maximal de la bande) avait disparue. L'absence d'impact du lavage a été validée en diffusant le PEG une deuxième fois sans agent perturbateur. Les résultats ont démontré que la vitesse de diffusion entre la première et la deuxième diffusion était la même, confirmant que l'élimination du PEG après le lavage était complète et que le lavage n'altérait pas la structure du biofilm de manière à affecter ses propriétés de transport.

Une fois le lavage complété, le PEG a été diffusé une deuxième fois en présence de l'agent potentiellement perturbateur. Pour mettre en évidence l'effet de l'EDTA, une nouvelle solution de PEG 3 (m/v) % dissout en présence de l'EDTA (7.5 (m/v) %) a été pompée dans la cellule pendant 60 min. La pénétration de l'EDTA dans les biofilms a été confirmée en suivant l'apparition d'une bande correspondant à l'élongation symétrique du groupe carboxylate (CO₂⁻) vers 1402 cm^{-1} , une zone où un minimum d'interférence spectrale est observée avec les contributions du biofilm et du PEG. Pour étudier l'effet de l'aspirine, une solution de PEG 3

(m/v) % contenant 80 mM d'aspirine a d'abord été diffusée pendant 1 heure après la première diffusion (2^{ème} diffusion). A la fin de cette période de diffusion, la pompe a été arrêtée et cette solution a été laissée en contact avec le biofilm pendant 80 heures (temps optimal suggéré dans la littérature) (Alem et Douglas, 2004). La caractérisation de la diffusion de l'aspirine a été effectuée en suivant l'apparition d'une bande vers 1200 cm^{-1} correspondant à l'élongation du lien C-O de l'ester. Après 80 heures de contact, la solution de PEG avec l'aspirine a été éliminée par lavage avec du PBS et une autre solution de PEG 3 (m/v) % (sans aspirine) a été diffusée (3^{ème} diffusion).

2.1.6. Acquisition et traitement des spectres

Le spectre de référence utilisé a été obtenu de 64 balayages enregistrés juste après la purge de la cellule avec de l'air sec. La croissance des biofilms était suivie par l'enregistrement de spectres dès le début de la phase d'inoculation jusqu'à la fin de la phase de croissance. Chacun des spectres comportait 1870 balayages à raison de 1 spectre/heure. Les spectres lors de la diffusion du PEG, par contre, étaient obtenus de 15 balayages, à raison de 1 spectre/30 secondes. Les spectres étaient enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} .

Initialement, tous les spectres ont été corrigés pour la dépendance de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente en fonction de la longueur d'onde. Cette correction a été effectuée avec le contrôle *Correction ATR avancée* du logiciel OMNIC. Pour ce faire, le nombre de réflexions sur la surface du cristal en contact avec le biofilm ainsi que les indices de réfraction du biofilm et du cristal ont été indiqués. Le biofilm étant constitué à 98% d'eau, l'indice de réfraction de cette dernière a été considéré comme celui de l'échantillon (Marcotte *et al.*, 2004). L'élimination de la contribution de l'eau dans les spectres a été ensuite effectuée en utilisant la méthode de Dousseau *et al.* (1989) basée sur l'élimination de la bande d'association de l'eau vers 2125 cm^{-1} . Au besoin, l'absorbance vers 1850 cm^{-1} était ramenée à zéro car aucune absorbance du biofilm n'était attendue à ce nombre d'onde. Les spectres de l'analyte étaient ainsi obtenus en soustrayant dans un premier temps le spectre du biofilm au spectre de diffusion

entre 1182 et 972 cm^{-1} , correspondant aux vibrations des liens C-O des sucres. Ensuite la contribution des agents perturbateurs a été éliminée du spectre de soustraction ainsi obtenu. L'élimination du spectre de l'aspirine a été effectuée par la soustraction du spectre de référence de l'aspirine, en utilisant la bande associée aux vibrations du lien CO de l'ester vers 1200 cm^{-1} comme étalon interne. La contribution de l'EDTA a été soustraite avec le spectre de référence de l'EDTA en utilisant la bande vers 1405 cm^{-1} , correspondant aux vibrations du lien carboxylate (COO^-).

2.1.7. Optimisation de la méthode

Pour étudier l'effet du débit, le milieu de culture a été introduit dans la cellule ATR à deux débits différents : 0.3 ml/min et 0.5 ml/min. Quant au traitement de cristal, la croissance du biofilm a été effectuée sur le cristal traité à l'éthanol et sur le cristal traité à l'éthanol puis au plasma. Pour la première série, le cristal était nettoyé uniquement avec de l'eau déionisée et de l'éthanol 70 % et puis un biofilm y était développé. Dans la deuxième série, le même cristal était nettoyé de la même façon que précédemment, avec de l'eau déionisée et de l'éthanol, puis était soumis au plasma à l'air (Plasma cleanser/sterilizer, Harrick, Ithaca, NY, É-U.) pendant 15 minutes comme traitement supplémentaire. Un biofilm était ensuite développé dans les mêmes conditions que précédemment. L'effet de chaque paramètre a été étudié sur la vitesse de croissance des biofilms ainsi que sur la couverture du cristal par le biofilm.

2.2. Diffusion locale

2.2.1. Produits chimiques

Les solutions de dextran 10k (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) 3 (m/v) % ont été préparées dans l'eau Milli-Q ($R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) sans EDTA ainsi qu'en présence de l'EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA) à des concentrations de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 5 et 7,5 (m/v) %. Le milieu de

culture TYE a été préparé avec 17 g/L de Trypticase Peptone (BBL, Cockeysville, MD, USA), 3 g/L d'extrait de levure (VWR, Edmonton, AB, Canada), 5 g/L de NaCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) et 2.5 g/L de Na_2HPO_4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) pour obtenir un milieu liquide. Le milieu solide a été obtenu en incluant 15 g/L d'agarose et 25 ml d'une solution de glucose 40% (Fluka, St. Louis, MO, USA). La solution de 40% de glucose et sucrose a été préparée par dilution dans l'eau Milli-Q. La solution tampon de PBS (pH 7.2) a été préparée avec 7.86 g/L de NaCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), 6.05 g/L de K_2HPO_4 (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 1.7 g/L KH_2PO_4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) dans l'eau Milli-Q. Toutes les solutions ont été stérilisées à l'autoclave avant leur utilisation.

2.2.2. Culture du biofilm et mesures du coefficient de diffusion locale

La souche de *S. mutans* (NCTC 10449) a été inoculée sur milieu solide TYE et incubée dans l'obscurité pendant 24 h à 37 °C. Une petite quantité de cellules a été transférée dans 10 ml de TYE liquide contenant 0.2 (m/v) % de sucrose et incubée à l'obscurité pendant 24 h à 37 °C. Un ml de la suspension bactérienne a été dilué 10 fois dans une solution TYE contenant 0.5 (m/v) % de sucrose. 500 µl ont été ajoutés dans chacun des puits d'une lamelle en verre de 8 puits et incubés dans l'obscurité pendant 24 h à 37 °C afin de former un biofilm dans chaque puits. Les biofilms ainsi formés ont été successivement lavés deux fois avec le tampon PBS et trois fois avec la solution de dextran destinée à la mesure du coefficient de diffusion. Un aliquote de 0.5 ml de la solution de dextran a été ajouté dans chaque puits et laissé pendant 20 minutes afin d'atteindre l'équilibre avant d'effectuer les mesures de SCF. Pour étudier l'effet de l'EDTA, la solution de dextran a été préparée avec les concentrations d'EDTA de 2, 4, 6 et 8 (m/v) %. La solution de dextran en absence de l'EDTA a été prise comme référence. Toutes les solutions ont été préparées dans du PBS à pH 7.0.

2.2.3. Acquisition des données

Les mesures SCF ont été effectuées selon la méthode décrite par Zhang *et al.* (2011) à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP5). Le dextran marqué a été excité à 488 ou 514 nm avec un laser à ions d'argon et les fluctuations d'intensité de fluorescence ont été mesurées avec un détecteur de photodiodes (Leica). Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel ISS Vista FCS (version 3.6_37).

Pour la détermination des coefficients de diffusion dans l'eau, des mesures ont été répétées 10 à 15 fois en un seul endroit en solution avec des temps d'acquisition de données de 100 à 200 s (temps nécessaire pour la collection des données avec un ratio signal/bruit adéquat). Dans les biofilms, des temps d'acquisition ont été augmentés à 200 à 500 s pour tenir compte de l'hétérogénéité des échantillons. En outre, dans les biofilms, chaque mesure a été répétée de 3 à 5 fois dans 6 à 8 emplacements choisis au hasard (déplacement spatial typique > 500 μm). Toutes les expériences ont été effectuées à la température ambiante (23.0 ± 1.5 °C).

2.3. Test d'inhibition des biofilms

Les biofilms ont été formés en ajoutant un volume de 1.2 ml de la culture primaire de *S. mutans* (voir section 2.1.3 plus haut) à 300 ml du milieu TYE 0.5 (m/v) % de sucrose. Ce mélange a ensuite servi à inoculer les plaques à 6 puits en borosilicate de 4 ml/puits (Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) puis incubé à 37 °C pendant 24 heures pour permettre la formation et l'adhésion des biofilms sur les plaques. A la fin de l'incubation, les cellules non adhérentes ont été éliminées des plaques par un lavage avec du PBS à pH 7.2. Après le lavage, 2 ml de la solution à tester ont été introduits dans les puits. La composition des solutions testées était la suivante : Pénicilline G aux concentrations de 25 g/L dans l'eau distillée contenant de l'EDTA 2 (m/v) % et dans l'eau distillée sans EDTA. Les biofilms ont été incubés en présence des solutions testées pendant 7 heures à 37 °C. A la fin de l'incubation, les puits ont été lavés avec le tampon PBS. Pour faciliter la récolte des biofilms des puits, 2 ml d'une solution de dextranase ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 2 heures à 37 °C. À la fin de l'incubation, la solution de dextranase a été éliminée et les puits ont été grattés à l'aide d'un grattoir pour

recupérer les biofilms. Les biofilms ainsi détachés ont été récoltés en introduisant dans chaque puits 1.5 ml d'une solution de cystéine-peptone contenant de l'EDTA à une concentration de 1 mM. Les agrégats des biofilms récoltés ont ensuite été brisés par ultrason pendant 2 minutes. Des dilutions sérielles ont été préparées dans un tampon PBS et les comptes viables ont été effectués dans les boîtes de Pétri contenant le milieu solide TYE 0.5% glucose après une incubation de 72 heures à 37 °C.

2.4. Imagerie par microscopie

Pour former le biofilm 1.2 ml de la culture primaire de *S. mutans* a été ajouté à 300 ml de milieu TYE contenant 0.5 (m/v) % de sucrose. Ce mélange a ensuite servi à inoculer les chambres de culture en borosilicate à 6 puits (Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) à raison de 0.45 ml/puits et incubé 24 heures à 37 °C. Les cellules non adhérentes aux puits après l'incubation ont été éliminées par un lavage avec du PBS à pH 7.2. Le témoin négatif a été obtenu en stérilisant le biofilm pendant 15 minutes à l'autoclave à 121 °C. Les biofilms ont été traités avec les concentrations désirées de PenG et d'EDTA et incubés 7 heures à 37 °C. Le témoin positif a été obtenu avec un puits traité uniquement avec du PBS à pH 7.2. Après l'incubation, les puits ont été lavés avec du PBS stérile et gardés à 4 °C jusqu'au test de coloration. Le test de coloration a été effectué en utilisant le kit Backlight Live/Dead (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Ce test a consisté à l'ajout de 1.75 µl propidium iodide, 1.25 µl Syto 9 et de 997.0 µl de solution saline (145 mM de NaCl et 10 mM de phosphate de sodium) dans chacun des puits. Le temps de coloration a été fixé à 15 minutes. Les colorants non intégrés ont été éliminés par lavage avec la solution saline. L'examen par microscopie à épifluorescence a été effectué à l'aide d'un microscope Laborlux 12 (Leitz, Kitchener, ON, Canada) équipé d'une caméra Infinity 2 (Lumenera Corporation, Ottawa, ON, Canada). L'examen par microscopie confocale a quant à lui été réalisé à l'aide du microscope Leica DMI6000 (Microsystems Inc., Concord, ON, Canada), aidé du logiciel de traitement de l'image TCS SP5, LASAF (Leica).

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1. Diffusion globale par IR-ATR

3.1.1. Optimisation de la méthode

Le protocole de croissance des biofilms sur une surface de cristal de ZnSe est bien décrit dans la littérature (Loesche, 1986; Marcotte *et al.*, 2004; Brook, 2005). Cependant, il s'est avéré important d'optimiser certains paramètres afin d'assurer une meilleure reproductibilité dans la croissance des biofilms. Le débit d'écoulement des liquides (inoculum et substrat frais TYE) pendant la période d'inoculation et de croissance des biofilms ainsi que le traitement du cristal ont eu un effet significatif sur le développement des biofilms à la surface du cristal dans la cellule ATR.

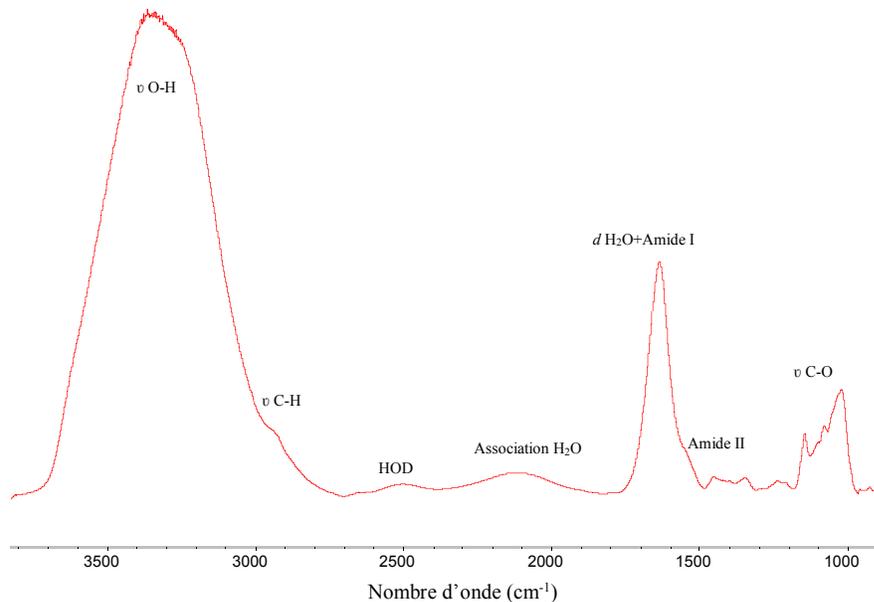


Figure 5 : Spectre infrarouge brut du biofilm de *S. mutans*. ν = élongation, d = déformation.

L'évolution de la croissance du biofilm à la surface du cristal a été suivie en enregistrant le spectre infrarouge du biofilm à chaque heure durant la croissance du biofilm. Le spectre infrarouge du biofilm ainsi obtenu est montré à la figure 5. La croissance en fonction du temps de l'aire de la bande d'élongation C-O des sucres constituant la matrice d'exopolysaccharides du biofilm, entre 1182 et 972 cm^{-1} , a permis de suivre le développement du biofilm à la surface du cristal (figure 6). L'augmentation de l'intensité de cette bande confirme la production des EPS et la colonisation du cristal par le biofilm.

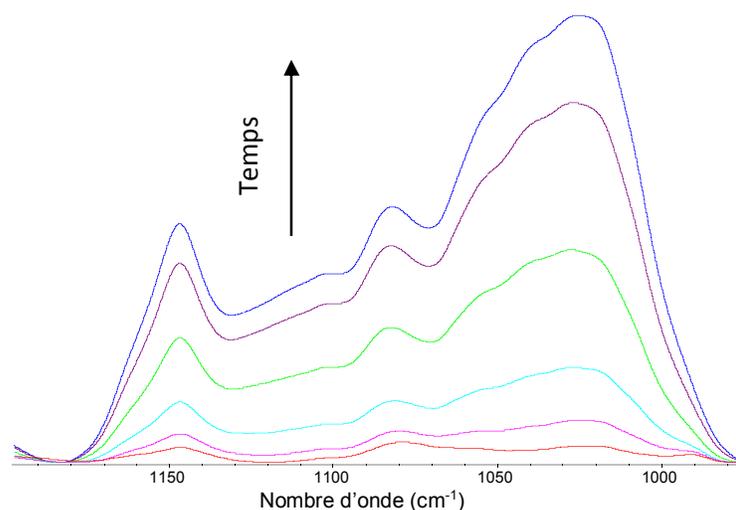


Figure 6 : Augmentation de l'aire de la bande C-O des polysaccharides lors de la croissance du biofilm après 10, 11, 13, 15, 17 et 19 heures de croissance.

L'influence du traitement du cristal ZnSe sur la croissance du biofilm est mise en évidence à la figure 7. Les 5 premières heures correspondent à l'étape de l'inoculation où le milieu de culture issu de la culture secondaire est introduit dans la cellule. Le but de cette étape est de permettre aux bactéries d'adhérer à la surface du cristal. Durant cette étape il n'y a aucune formation de biofilm proprement dit et la densité des sucres à la surface du cristal reste très faible. Ceci se traduit par une similitude dans la courbe de l'aire en fonction du temps pour les deux types de traitement. Après l'étape d'inoculation, il s'ensuit donc une augmentation de l'aire en fonction du temps qui devient observable après 6 h de croissance. Cette augmentation est due à l'introduction du milieu de culture frais contenant du sucrose dans la cellule afin d'initier le processus de formation des biofilms par les bactéries attachées à la surface du cristal.

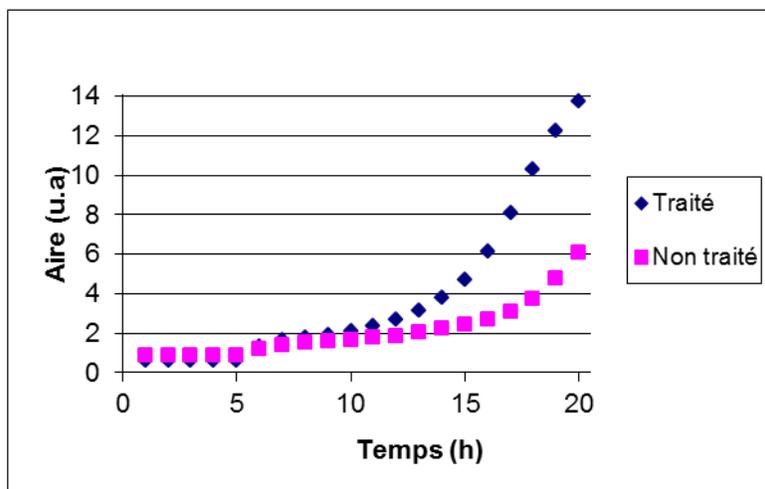


Figure 7 : Croissance du biofilm cultivé sur un cristal traité et non traité au plasma, telle que décrite par l'aire de la bande d'élongation de C-O des sucres de la matrice d'exopolysaccharides.

Entre 6 à 10 h de croissance, la variation de l'aire n'est pas très significative au sein du même biofilm et l'effet du traitement du cristal sur la croissance des biofilms n'est pas observable. Après dix heures de croissance, la différence entre les deux traitements devient de plus en plus significative. Le biofilm qui se développe sur le cristal traité au plasma acquiert plus de densité par rapport à celui formé sur le cristal uniquement traité à l'éthanol. Après 20 h de croissance, la densité des sucres à la surface du cristal est plus de deux fois plus importante pour le cristal traité au plasma, suggérant une meilleure adhérence initiale des bactéries par rapport au cristal uniquement traité avec de l'eau et de l'éthanol. La figure 8 confirme visuellement les différences d'absorbances mesurées. Elle montre la densité des biofilms sur le cristal traité au plasma et sur celui uniquement traité à l'éthanol. On peut y noter une présence plus abondante des bactéries (film blanc) sur le cristal (fond jaune) traité au plasma (figure 8a) par rapport à celui nettoyé uniquement avec de l'eau et de l'éthanol (figure 8b). L'origine de cette différence est discutée à la section 4.1. Pour le moment, à la lumière de ces résultats, nous avons décidé que le cristal ZnSe utilisé pour la culture des biofilms serait nettoyé au plasma avant chaque expérience.

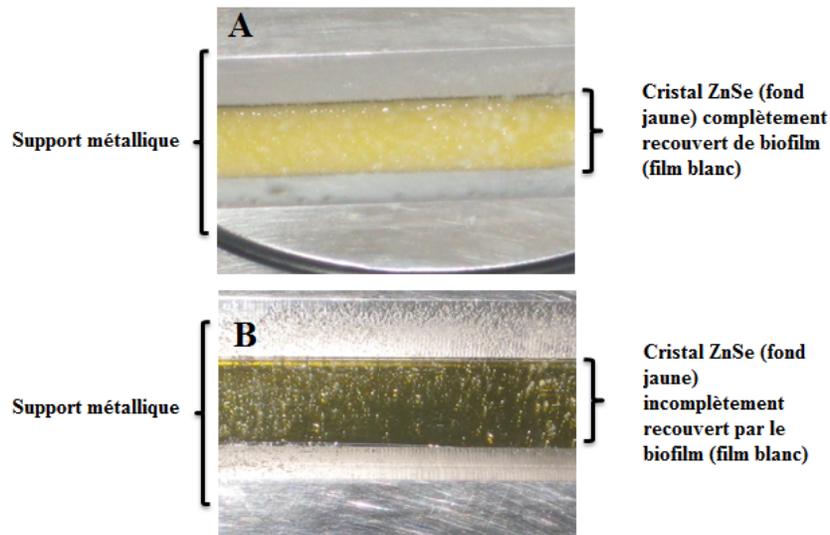


Figure 8 : Vue de dessus de la cellule ATR. Le biofilm y apparait sous forme de film blanc sur fond jaune (cristal ATR). Le cristal ZnSe a été préalablement nettoyé au plasma (A) et à l'éthanol uniquement (B). L'image (B) démontre que l'absence du nettoyage au plasma a une influence sur l'adhésion des biofilms à la surface du cristal ZnSe.

Les figures 9 et 10 présentent les courbes de croissance du biofilm obtenues pour les deux débits étudiés, soit 0.3 et 0.5 ml/min. On n'y observe aucun changement durant les 5 premières heures correspondant à la période d'inoculation. L'augmentation de l'aire sous la bande d'élongation C-O commence après 5 h, soit lors de la phase de croissance proprement dite des biofilms suite à l'apport du milieu de culture frais. L'effet du débit se manifeste après 10 h de croissance (incluant le temps d'inoculation). L'augmentation de l'aire suite à la formation du biofilm à la surface du cristal est plus rapide avec un débit de 0.3 ml/min par rapport au débit de 0.5 ml/min suggérant une croissance plus rapide avec le plus faible débit. On peut également remarquer que la courbe de croissance atteint un plateau après 18 h de croissance avec un débit de 0.3 ml/min alors qu'aucune saturation n'est survenue après 20 heures de croissance avec le débit de 0.5 ml/min.

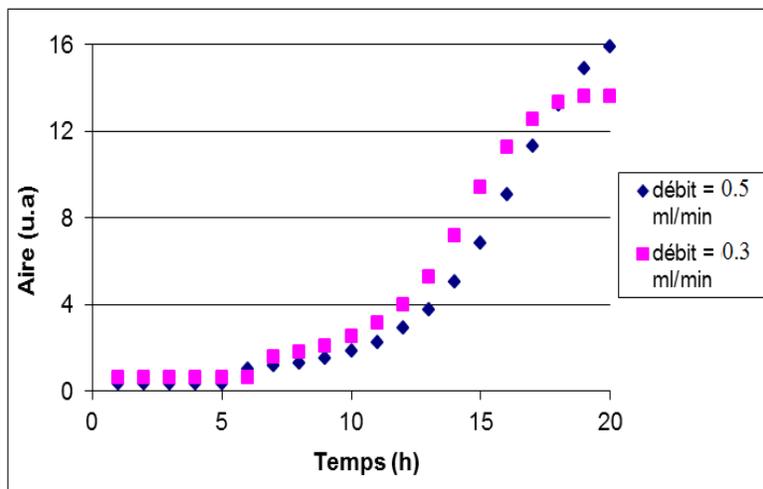


Figure 9 : Influence du débit sur la croissance du biofilm telle qu'observée à partir de l'aire de la bande d'élongation du lien C-O des sucres formant la matrice d'exopolysaccharides.

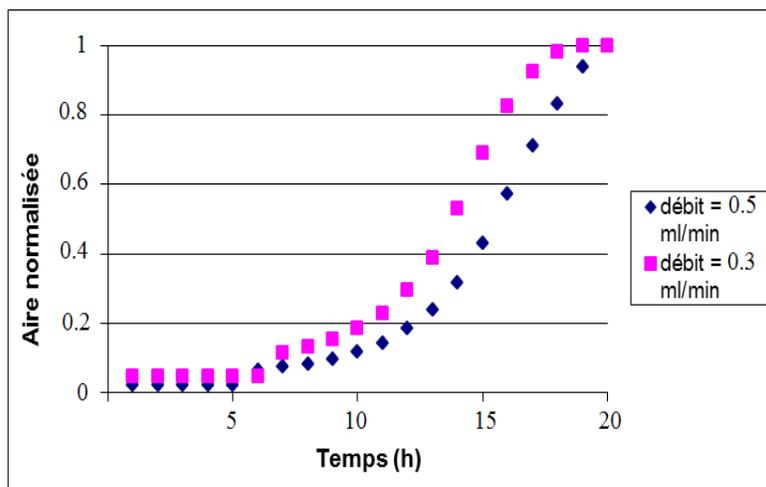


Figure 10 : Aire normalisée (par rapport à la valeur la plus élevée) de la bande d'élongation du lien C-O des sucres formant la matrice d'exopolysaccharides des biofilms en fonction du temps et sous deux différentes conditions de débit.

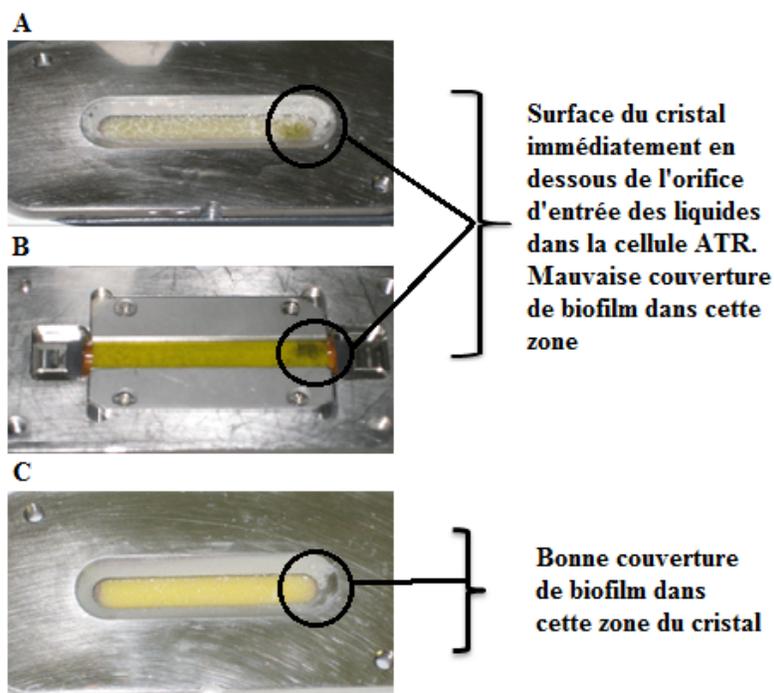


Figure 11 : Influence du débit sur la couverture de cristal ZnSe par le biofilm. A et B représentent la vue du dessus (A) et du dessous (B) du cristal ensemencé avec un débit de 0.5 ml/min pendant 25 h. C représente le cristal ensemencé avec un débit de 0.3 ml/min pendant 20 h.

L'obtention du plateau représente la saturation de la région près du cristal balayée par l'onde évanescente en biofilm. Ceci est l'indicatif de l'arrêt de la croissance horizontale ou latérale à la surface du cristal bien que le biofilm continue de croître en épaisseur (croissance verticale). Le débit de 0.3 ml/min donne donc une courbe de croissance à trois régions, soit la région représentant la phase d'inoculation où aucun biofilm n'est développé à la surface du cristal, la région de croissance proprement dite, ainsi que le plateau (arrêt de la croissance horizontale). Par contre avec le débit de 0.5 ml/min la colonisation de la surface du cristal par le biofilm près de la zone évanescente est incomplète et la zone du plateau dans la courbe de croissance est inexistante.

La figure 11 permet de mieux expliquer cette différence. Elle montre l'état du cristal après 25 et 20 h de croissance pour les biofilms développés avec un débit de 0.5 et 0.3 ml/min. Avec un débit de 0.5 ml/min, la zone du cristal en-dessous de l'orifice d'entrée des liquides (inoculum et substrat frais de TYE) possède une plus faible densité des biofilms par rapport aux régions plus

éloignées. Ce résultat explique la différence de la vitesse de croissance des biofilms observée par spectroscopie IR. Il semble que les turbulences en-dessous de la zone d'entrée des liquides entraînent une lente croissance des biofilms dans cette zone lorsque le débit est de 0.5 ml/min. Ceci a comme conséquence une croissance hétérogène du biofilm à la surface du cristal avec un espace quasi découvert juste en dessous de l'orifice d'entrée des solutions. La croissance du biofilm dans la région des turbulences s'est faite plus lentement, ce qui serait à l'origine de l'absence du plateau dans la courbe de croissance. De plus il en résulte une hétérogénéité plus prononcée dans l'épaisseur des biofilms. Ces conditions sont défavorables à nos analyses car le modèle utilisé pour l'analyse des données suppose une épaisseur uniforme du biofilm. La densité plus faible près de l'entrée des liquides pourrait être associée aux forces de cisaillement créées par le flot d'écoulement des liquides dans la cellule ATR. Celles-ci sont plus grandes dans les régions plus proches de l'orifice d'entrée.

3.1.2. Diffusion du PEG

Avant de commencer l'étude des effets des agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms, la diffusion du PEG 2k à travers les biofilms a été effectuée. Cette diffusion a servi d'étalon dans notre étude. De plus, il était important de comparer les paramètres de diffusion obtenus avec ceux rapportés dans la littérature (Marcotte *et al.*, 2004). Le but de l'introduction du PBS avant la diffusion du PEG était de priver les cellules bactériennes de leur source d'alimentation afin de restreindre la croissance des biofilms. Cette étape était importante puisque dans notre cas, la diffusion s'est faite durant une longue période du temps, soit 1 h. Il était donc important de minimiser le changement d'épaisseur des biofilms car, comme l'illustre l'équation 2, l'épaisseur est un facteur qui influence la diffusion d'un soluté et l'atteinte de la surface du cristal. Si l'épaisseur devait varier considérablement durant l'expérience, il aurait été difficile de comparer deux courbes de pénétration enregistrées en séquence, afin de mettre en relief l'effet potentiel d'un traitement altérant la pénétrabilité du biofilm. Le remplacement du milieu TYE par le PBS a également permis de simplifier les interférences spectrales car les solutions à diffuser étaient préparées dans le tampon PBS. Il était important de s'assurer que le

milieu PBS soit uniformément distribué avant l'amorce de la diffusion du composé d'intérêt. L'évolution de l'aire de la bande correspondant aux vibrations du lien phosphate représente la cinétique de pénétration de PBS dans le biofilm et est mise en relief dans la figure 12. On y observe l'apparition d'une bande vers 990 cm^{-1} par rapport au spectre du PEG de référence.

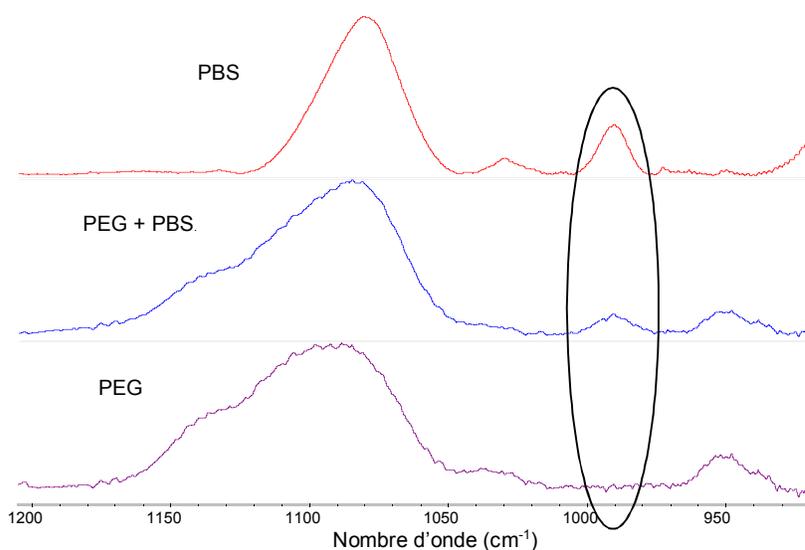


Figure 12 : Mise en relief de la bande de phosphate vers 990 cm^{-1} dans le spectre du PEG. Comparaison avec le spectre du PEG de référence et celui du PBS. L'apparition de cette bande confirme le remplacement du milieu de culture par la solution PBS. Les spectres de différence sont obtenus de la soustraction du spectre du biofilm du spectre enregistré après la diffusion du PEG (biofilm + PEG).

Cette cinétique de pénétration du PBS est illustrée à la figure 13. D'après cette figure, un temps de 10 minutes était suffisant pour remplacer le milieu de culture par la solution de PBS dans la zone à proximité du cristal, sondée par l'onde évanescente. Ainsi, le PBS a été laissé à diffuser pendant 30 minutes avant la diffusion du PEG afin de s'assurer de l'homogénéité du milieu dès les premières minutes de la diffusion. Après le remplacement du TYE par le PBS dans les biofilms, le PEG 2k a été diffusé. Pour estimer le temps nécessaire à allouer à l'entrée de la solution diffusante dans la cellule ATR avant le début de l'enregistrement des spectres, 1% de D_2O , existant principalement sous forme de HOD, a été ajouté à la solution à diffuser. Le choix de D_2O se justifie par sa diffusion qui est très rapide à travers les biofilms ainsi que sa contribution bien dégagée dans le spectre infrarouge (Marcotte *et al.*, 2004).

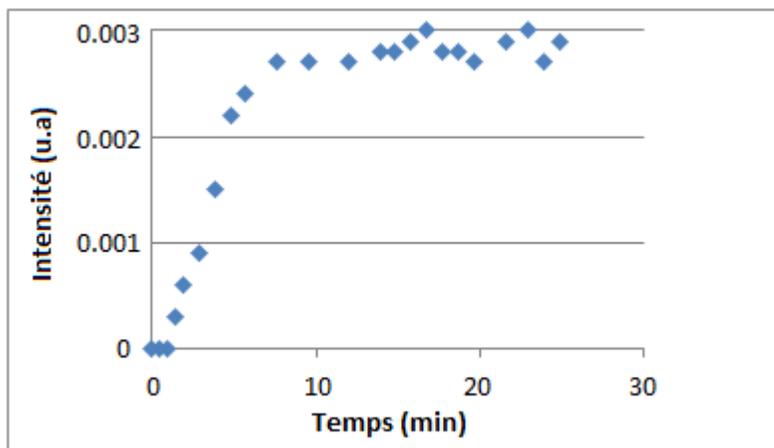


Figure 13 : Cinétique de pénétration de PBS caractérisée à partir de la variation en fonction du temps, de l'intensité de la bande vers 990 cm^{-1} due à la vibration du groupement phosphate.

La figure 14 présente la variation de l'intensité de la bande associée à l'élongation O-D vers 2500 cm^{-1} associée au HOD en fonction du temps. Dans ce cas spécifique, le temps $t = 0$ est défini comme le temps à partir duquel la solution à faire diffuser arrive dans la cellule ATR et est désigné par t_a (figure 15). Il a été déterminé que cela prenait 30 secondes au liquide dans le réservoir du milieu à diffuser pour atteindre la cellule ATR une fois que la pompe est démarrée. Si on désigne par t_d le temps du départ de la pompe, le temps t_a est égal à $t_a = t_d + 30$ secondes.

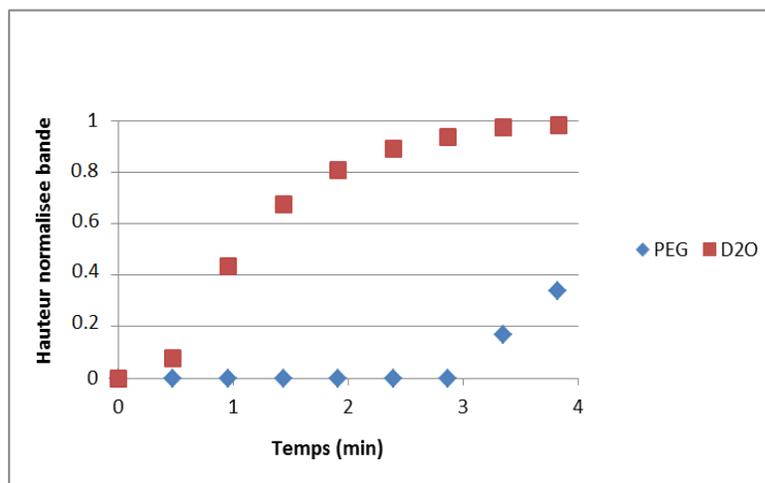


Figure 14 : Cinétique de pénétration du D₂O et du PEG. Intensité en fonction du temps de la bande d'élongation O-D associée au HOD vers 2500 cm⁻¹ et de C-O du PEG vers 1085 cm⁻¹. Le temps $t = 0$ est égal à t_a (arrivée de la solution dans la cellule ATR, voir figure 15).

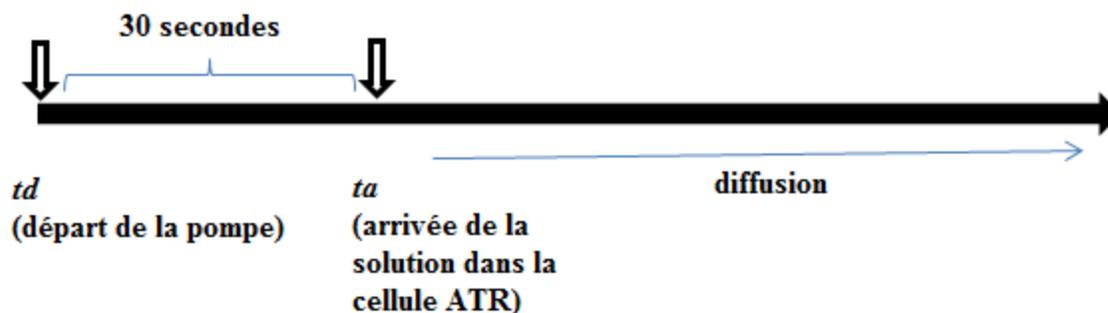


Figure 15: Chronologie d'entrée des liquides dans la cellule ATR. $t_a = t_0$ utilisé pour les présentations des cinétiques de pénétration, $t_a + 30$ s: temps pour lequel on obtient 10% de l'intensité de la bande d'élongation OD associée à HOD dans le spectre, $t_a + 60$ s: temps généralement utilisé comme t_0 dans les simulations des cinétiques, $t_a + 90$ s: temps pour lequel on obtient 70% de l'intensité de la bande d'élongation OD associée à HOD dans le spectre.

L'intensité de la bande d'élongation O-D atteint un plateau comme illustré dans la figure 14. La stabilisation de cette bande est une indication que la solution à diffuser au-dessus du biofilm a été complètement remplacée par le milieu diffusant désiré. On peut remarquer sur cette figure qu'environ 10 % de HOD atteint la zone balayée par l'onde évanescente près de l'interface cristal – biofilm 30 s après l'arrivée de la solution à diffuser dans la cellule. Environ 70 % du

signal de HOD est détecté 1.5 minutes après l'entrée du milieu diffusant dans la cellule ATR. Pour le calcul du coefficient de diffusion du PEG, le temps $t = 0$ est désigné par t_0 . Au temps t_0 , il est supposé que le liquide au-dessus du biofilm a été complètement remplacé par la solution à faire diffuser. Ce moment n'est pas précisément déterminé expérimentalement. Nous avons fait différentes simulations en variant t_0 entre $t_a + 30$ secondes (lorsque le signal de l'élongation O-D atteint 10% de sa valeur maximale) et $t_a + 90$ s (lorsque le signal de l'élongation O-D atteint 70% de sa valeur maximale). Aucune variation significative n'a été observée dans la valeur du coefficient de diffusion obtenu. Lors de la diffusion du PEG, le temps t_0 a été fixé à $t_0 = t_a + 30$ secondes (ou lorsque 10 % de D₂O atteint la zone balayée par l'onde évanescente). Le choix de $t_0 = t_a + 30$ secondes est également motivé par le fait qu'aucun signal du PEG n'est détecté à la base du biofilm à ce temps.

La bande du PEG a été mise en évidence après la soustraction du spectre du biofilm enregistré immédiatement avant la diffusion. La figure 16 illustre la méthode de soustraction et montre que le spectre de différence obtenu après cette correction correspond bien à celui du PEG 2k en solution.

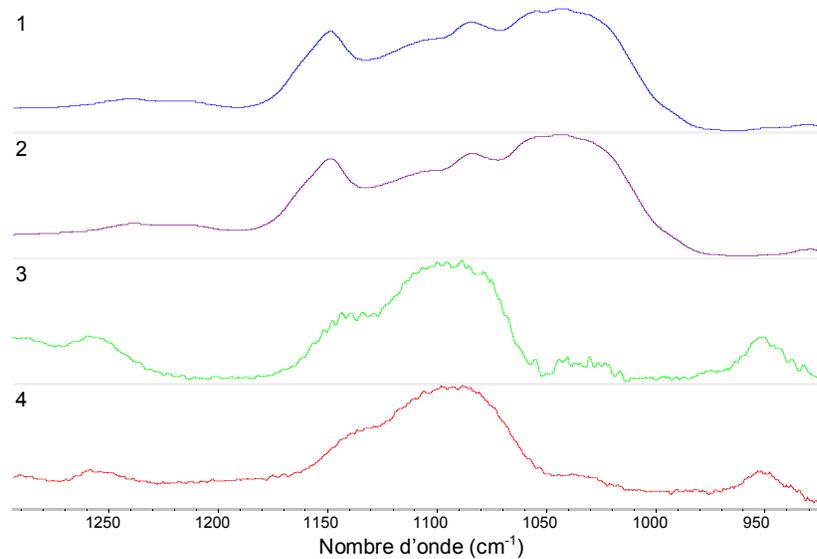


Figure 16 : Mise en relief de la contribution du PEG. De haut en bas: 1) spectre du biofilm après 60 minutes de diffusion de la solution contenant le PEG 2) spectre de référence du biofilm 3) spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 1-2. 4) spectre de référence du PEG 2k.

La figure 17 illustre le profil de pénétration du PEG dans les biofilms près du cristal ATR. D'après cette figure, la concentration de PEG près du cristal ATR augmente pour atteindre un plateau après 20 minutes de diffusion. Ceci corrobore les résultats précédents rapportés dans la littérature (Marcotte *et al.*, 2004). Le tableau 1 donne les valeurs des paramètres de diffusion obtenus ainsi que leur similarité avec les valeurs rapportées dans la littérature.

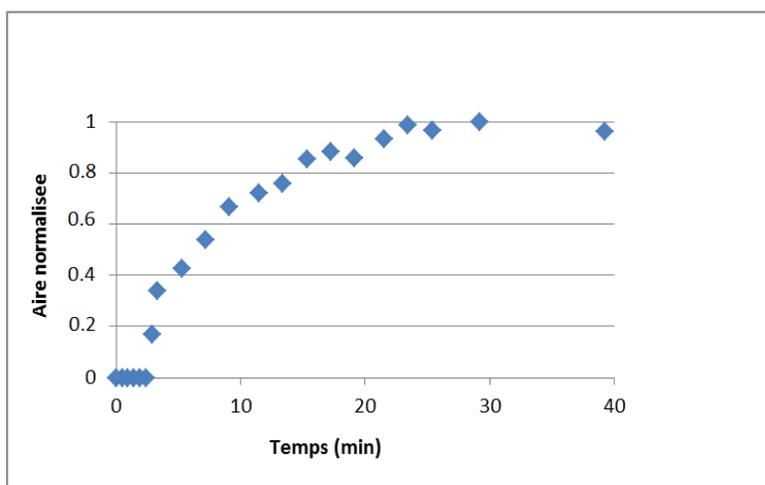


Figure 17 : Cinétique de pénétration du PEG caractérisé à l'aide de l'aire de la bande C-O du PEG en fonction du temps. Le temps t_0 correspond à $ta + 30$ s.

Tableau 1: Comparaison des valeurs de B, D et de pénétrabilité obtenues lors de la diffusion du PEG dans le biofilm de *S. mutans* avec celles de la littérature.

B (10^{-3} s^{-1})	D ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	Épaisseur du biofilm (μm)	Pénétrabilité (%)
3.7 ± 0.9	7.8 ± 2.8	190 ± 75	27 ± 9
$4.6 \pm 1.4^*$	$2.7 \pm 0.8^*$	$120 \pm 32^*$	$25 \pm 10^*$
$4.2 \pm 1.8^{**}$	$5.4 \pm 1.3^{**}$	$180 \pm 70^{**}$	$48 \pm 14^{**}$

Valeurs obtenues dans la littérature * (Marcotte *et al.*, 2004) ** (Sandt *et al.*, 2007)

3.1.3. Effet de l'EDTA

L'étude de l'effet de l'EDTA sur la diffusion du PEG a été effectuée sur un biofilm pour lequel une première expérience de diffusion du PEG 2k seul a été effectuée. Avant de faire la série de

mesures de la diffusion du PEG 2k en présence d'EDTA, le biofilm a été lavé avec la solution de PBS afin de chasser tout le PEG issu de la première diffusion. Selon la figure 18, le lavage, vérifié par la diminution de la hauteur de la bande associée à l'élongation du lien C-O vers 1085 cm^{-1} a été complété après 2 h à un débit de 0.5 ml/min . Le PBS a été mis en circulation dans la cellule pendant 3 h au total pour s'assurer de l'élimination de toute trace de PEG dans la cellule ATR. Lors de la deuxième diffusion, la pénétration de l'EDTA dans les biofilms a été confirmée par l'apparition de la bande correspondant à l'élongation symétrique du groupe carboxylate (CO_2^-) vers 1402 cm^{-1} (figure 19).

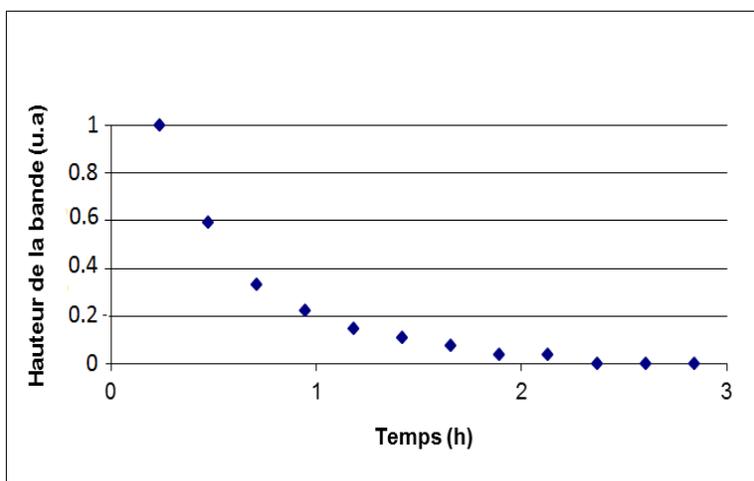


Figure 18 : Lavage du biofilm par une solution de PBS. La concentration de PEG à l'interface est estimée par la hauteur de la bande d'élongation C-O à 1085 cm^{-1} .

Les soustractions spectrales pour mettre en évidence les bandes du PEG et de l'EDTA sont illustrées à la figure 19. Initialement, la soustraction des contributions du biofilm s'est faite de la même façon que pour les spectres de diffusion du PEG seul. Ensuite nous avons procédé à l'élimination de la contribution de l'EDTA. Pour ce faire, la bande associée à l'élongation de groupe carboxylate vers 1402 cm^{-1} a été employée comme standard interne d'intensité. Nous avons soustrait le spectre d'une solution d'EDTA, afin de minimiser l'intensité de cette bande, du spectre du PEG diffusé. Le résultat de cette soustraction montre une similitude entre le spectre du PEG diffusé avec le spectre du PEG servant de référence. La diffusion de l'EDTA jusqu'à la base du biofilm a été confirmée par l'augmentation du signal vers 1402 cm^{-1} en fonction du temps de diffusion (figure 20).

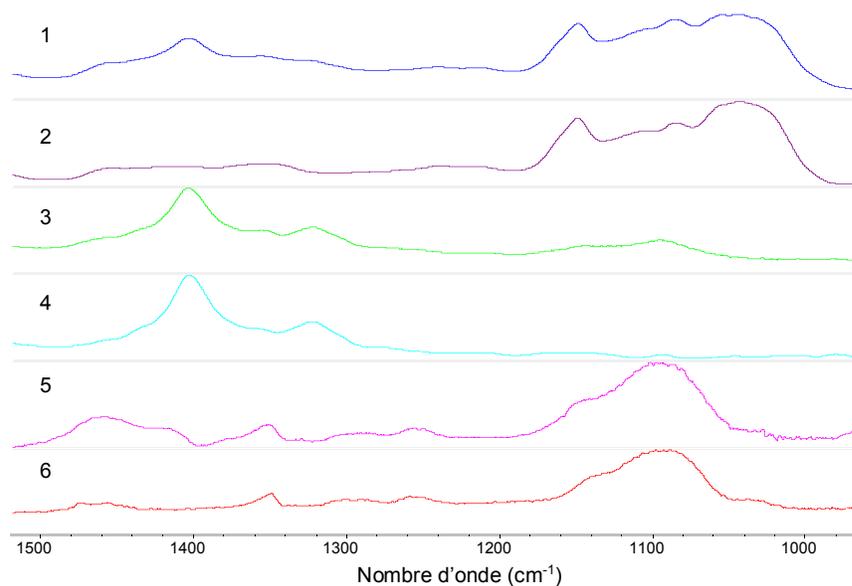


Figure 19 : Mise en relief de la contribution du PEG en présence de l'EDTA. De haut en bas : 1) spectre du biofilm après 60 minutes de diffusion de la solution contenant le PEG + EDTA 2) Spectre de référence du biofilm 3) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 1-2. 4) Spectre de référence de l'EDTA 5) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 3-4. 6) Spectre de référence du PEG.

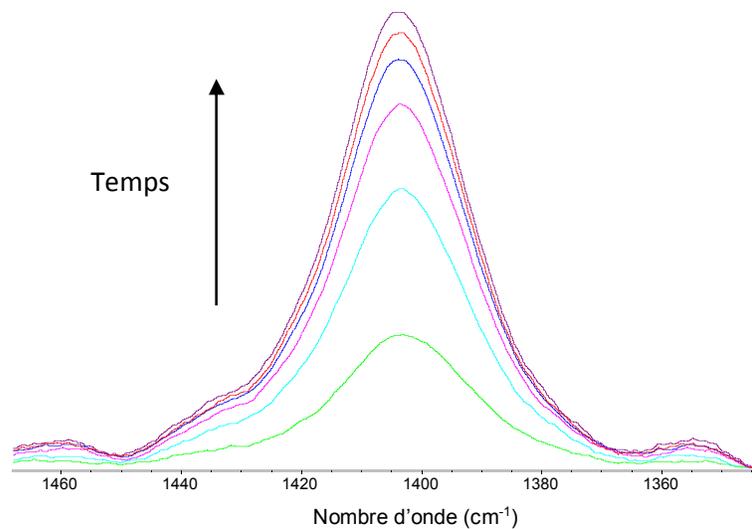


Figure 20 : Croissance de la bande associée à l'élongation du groupe carboxylate de l'EDTA vers 1402 cm^{-1} après 1.4, 1.9, 2.4, 2.9, 3.4 et 3.9 minutes de diffusion.

Les vitesses de diffusion du PEG, de l'EDTA ainsi que celle du HOD sont illustrées à la figure 21. Le temps $t = 0$ correspond à t_a (c'est-à-dire lorsque la solution diffusante atteint la cellule ATR). On peut noter le fait qu'aucun signal du PEG n'est détecté après 30 secondes de

circulation de la solution diffusante dans la cellule ATR alors que le D₂O et l'EDTA atteignent déjà l'interface cristal-biofilm. Comme dans le cas de la diffusion du PEG seul, $t = 0$ utilisé pour les simulation est fixé à $t_0 = t_a + 30$ secondes.

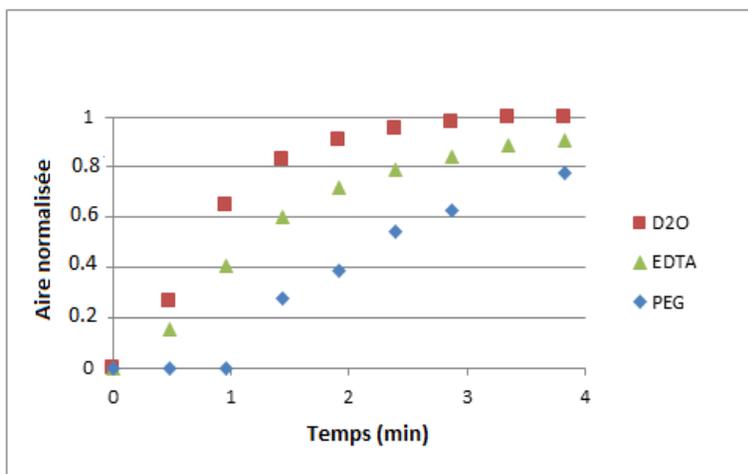


Figure 21 : Cinétique de pénétration de l'EDTA, du HOD ainsi que du PEG à l'intérieur d'un biofilm de *S. mutans*. Le temps $t = 0$ correspond à t_a (arrivée de la solution dans la cellule ATR). L'aire est normalisée à 1 par rapport à la valeur la plus élevée.

L'effet de l'EDTA sur la diffusion du PEG est mis en évidence aux figures 22 et 23. On y observe qu'en présence d'EDTA, le PEG diffuse environ deux fois plus vite que lorsqu'il diffuse seul, en atteignant un plateau après 10 minutes de diffusion au lieu de 20 minutes. Les valeurs des différents paramètres de diffusion pour le PEG diffusant dans les deux conditions sont représentées au tableau 2. Comme on peut le constater en comparant les différentes valeurs de B, de D ainsi que de la pénétrabilité, la pénétration du PEG dans le biofilm de *S. mutans* se trouve améliorée en présence de l'EDTA. Le coefficient de diffusion a augmenté d'un facteur 3 et la pénétrabilité du PEG est deux fois plus grande, suggérant une plus forte concentration de PEG à la base du biofilm en présence de l'EDTA.

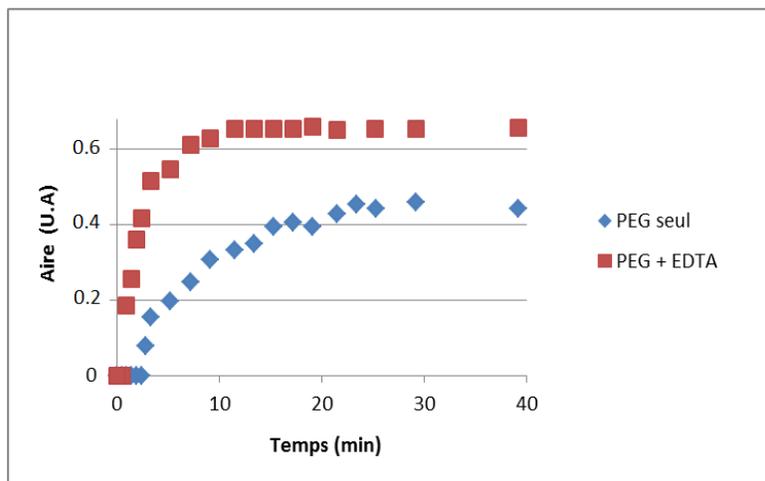


Figure 22 : Mise en évidence de l'effet de l'EDTA sur la pénétration du PEG 2k par comparaison de l'aire sous la bande d'absorption du lien C-O du PEG diffusant seul et en présence de l'EDTA dans le biofilm de *S. mutans*.

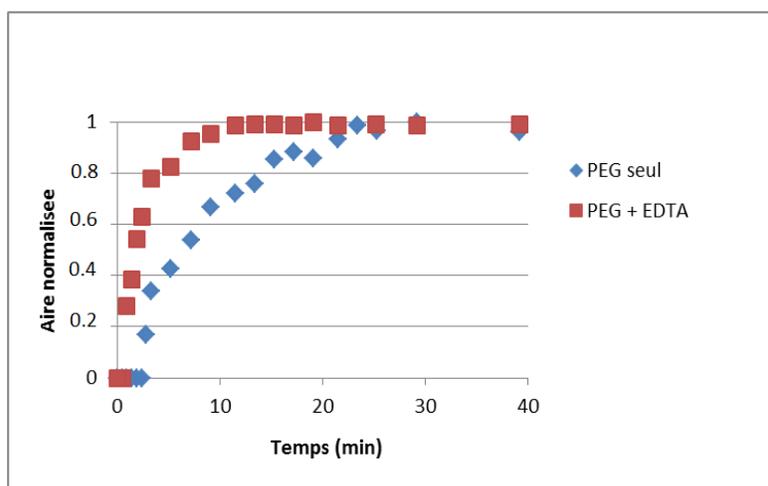


Figure 23 : Mise en évidence de l'effet de l'EDTA dans la vitesse de pénétration du PEG 2k par comparaison de l'aire normalisée sous la bande d'absorption du lien C-O du PEG 2k diffusant seul et en présence de l'EDTA dans le biofilm de *S. mutans*. L'aire est normalisée à 1 par rapport à la valeur la plus élevée.

Tableau 2: Effet de l'EDTA sur les propriétés de diffusion du PEG dans le biofilm de *S. mutans*

	B (10^{-3} s^{-1})*	D ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)*	Pénétrabilité (%)*
PEG seul**	2.6 ± 0.8	6.8 ± 2.1	27 ± 9
PEG + EDTA	8.3 ± 3.7	20.3 ± 9.1	47 ± 21

* n = 3, ** Valeurs obtenues avant la diffusion du PEG en présence de l'EDTA. Ces valeurs sont spécifiques aux mesures effectuées lors des tests de détermination de l'effet de l'EDTA. Elles ne sont pas additionnées avec les valeurs de PEG seul obtenues lors des tests de validation de la méthode ni celles pour la détermination de l'effet de l'aspirine effectués sur les biofilms distincts.

Il s'est avéré important de déterminer si l'augmentation de la vitesse de pénétration ainsi que de la pénétrabilité du biofilm en présence de l'EDTA était due à l'effet perturbateur de ce dernier sur la structure des biofilms ou plutôt au détachement de parties du biofilm à la surface du cristal. A la fin de la période de diffusion du PEG en présence de l'EDTA, un deuxième lavage a été effectué dans le but de chasser tout le PEG ainsi que l'EDTA, et ainsi comparer le spectre du biofilm obtenu après le deuxième lavage avec celui de référence, enregistré juste avant la diffusion du PEG avec l'EDTA.

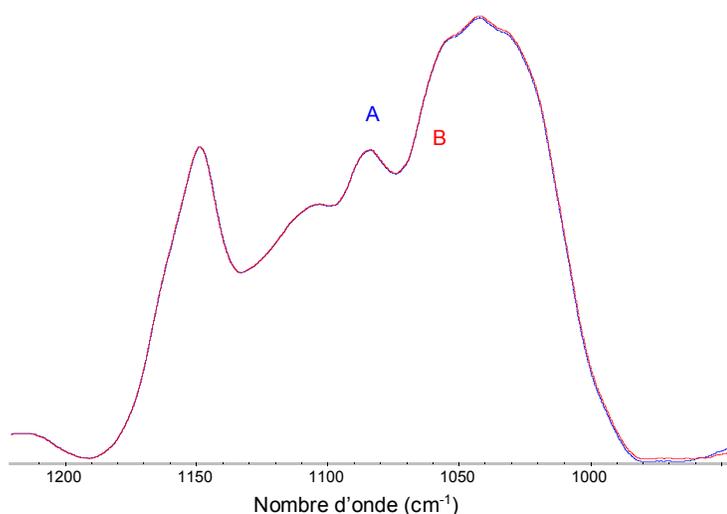


Figure 24 : Spectre du biofilm A) avant la diffusion du PEG+EDTA et B) après la diffusion du PEG+EDTA.

Comme en témoigne la figure 24, la région correspondant à l'élongation du lien C-O des sucres ne montre aucune différence significative avant comme après la diffusion du PEG avec l'EDTA. La différence de l'aire de cette bande est d'environ 2%, synonyme de l'arrêt de croissance horizontale (le long du cristal). Afin de déterminer si le lavage a eu un certain impact négatif (détachement des morceaux du biofilm conduisant à une diminution de l'épaisseur) ou positif (continuation de la croissance verticale conduisant à une augmentation de l'épaisseur), une deuxième diffusion du PEG seul sans agent perturbateur a été préalablement effectuée (données non montrées) sur le biofilm immédiatement après le lavage avec du PBS. Aucune différence dans les paramètres de diffusion du PEG n'a été relevée. Ces résultats confirment la fiabilité de

la méthode et sous-entendent que l'amélioration des paramètres de diffusion est la conséquence de l'effet de l'EDTA sur les propriétés de transport de PEG à travers le biofilm de *S. mutans*.

3.1.4. Effet de l'aspirine

Un protocole similaire à celui décrit pour l'EDTA a été utilisé pour étudier l'effet de l'aspirine. Pour cette partie, l'EDTA a été remplacé par l'aspirine 80 mM dans la solution de diffusion. La caractérisation de la diffusion de l'aspirine a été effectuée en suivant l'apparition d'une bande vers 1200 cm^{-1} correspondant à l'élongation du lien C-O de son ester. L'augmentation de l'aire associée à cette bande confirme de la diffusion de l'aspirine à la base du biofilm (figure 25).

La figure 26 illustre les soustractions spectrales mettant en évidence les bandes du PEG et de l'aspirine. Ces soustractions ont été effectuées de la même façon que lors de la détermination de l'effet de l'EDTA, sauf que dans ce cas, c'est la soustraction de la bande vers 1200 cm^{-1} qui a été effectuée comme standard interne d'intensité pour éliminer la contribution de l'aspirine. La similitude entre le spectre issu des soustractions et celle du PEG de référence confirme de la fiabilité de la méthode. Les vitesses de diffusion de l'aspirine, de HOD ainsi que du PEG sont illustrées dans la figure 27. Le temps $t = 0$ sur le graphique a été fixé comme précédemment dans l'étude de l'effet de l'EDTA. Il correspond donc à t_a (arrivée de la solution contenant le PEG 2k et l'aspirine dans la cellule ATR). Comme dans le cas de l'EDTA, aucun signal n'a été mesuré dans la base du biofilm dans les 60 secondes suivant l'arrivée de la solution dans la cellule ATR. Le temps $t = 0$ dans la détermination de l'effet de l'aspirine sur la diffusion du PEG par simulation est fixé de la même façon que dans le cas de l'EDTA, soit $t_0 = t_a + 30$ secondes.

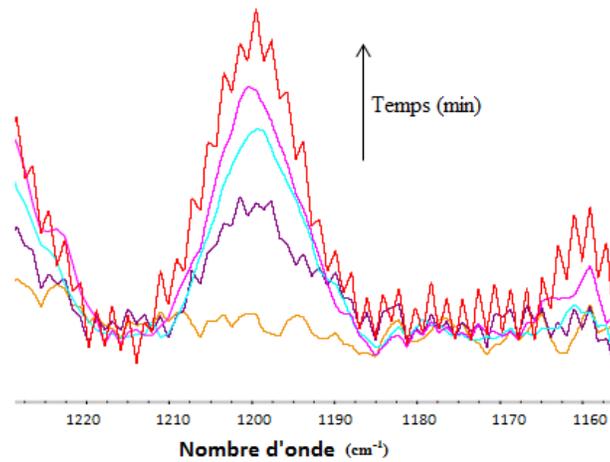


Figure 25 : Apparition de la bande à 1200 cm^{-1} associée à l'élongation du lien C-O de l'ester suite à la diffusion de l'aspirine à travers le biofilm après 0, 2.0, 2.5, 3.0 et 3.5 minutes.

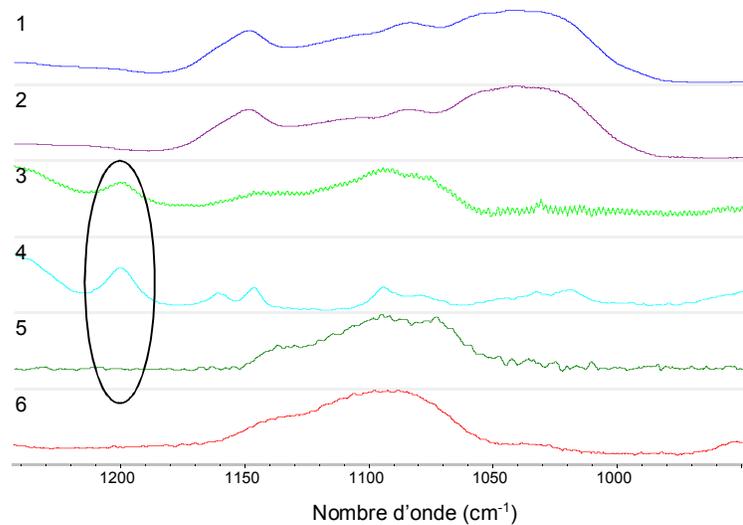


Figure 26 : Mise en évidence de la contribution du PEG en présence de l'aspirine. 1) Spectre de diffusion après 60 minutes de diffusion du PEG avec l'aspirine. 2) Spectre du biofilm avant la diffusion. 3) Spectre de différence résultant de la soustraction de spectre 1 moins 2 = spectre du PEG + aspirine. 4) Spectre de l'aspirine. 5) Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre 3 moins 4 = spectre du PEG. 6) Spectre de référence du PEG.

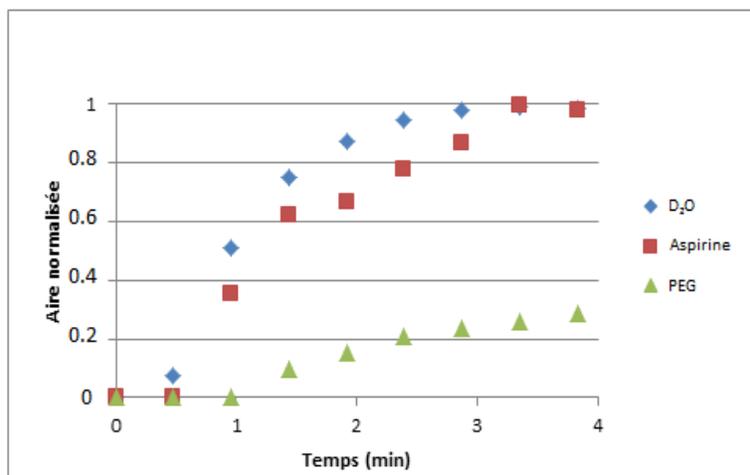


Figure 27 : Cinétique de pénétration de l'aspirine, du HOD ainsi que du PEG dans un biofilm de *S. mutans*. Le temps $t = 0$ correspond au temps t_a (le temps d'arrivée de la solution dans la cellule ATR).

Lors de la diffusion du PEG en présence de l'aspirine, pratiquement aucun effet n'a été observé dans la perméabilité du biofilm par rapport à la diffusion du PEG seul. Les courbes de diffusion du PEG en présence et en absence de l'aspirine sont illustrées à la figure 28. On n'y observe aucune différence tant dans la cinétique de diffusion du PEG que dans la pénétrabilité du biofilm lorsque le PEG est diffusé dans les trois conditions de diffusion. Les valeurs extraites de ces cinétiques sont présentées au tableau 3.

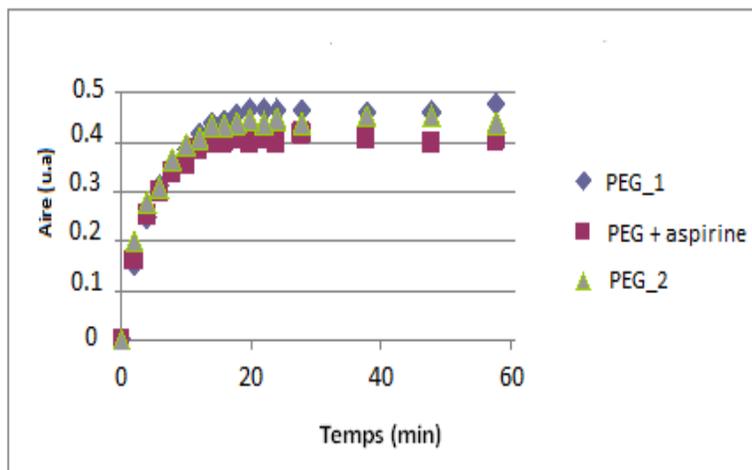


Figure 28 : Étude de l'effet de l'aspirine dans la cinétique de pénétration du PEG à travers le biofilm. Le temps $t = 0$ est désigné par t_0 , qui correspond à $t_a + 30$ secondes. La première cinétique (PEG_1) représente l'expérience de diffusion du PEG seul. La cinétique PEG + aspirine représente celle obtenue lors de la diffusion du PEG en présence d'aspirine. La cinétique PEG_2 est obtenue lors de la 3^{ème} diffusion du PEG après que le biofilm ait été laissé en contact avec l'aspirine pendant 80 h. Les cinétiques sont obtenues sur le même biofilm.

Tableau 3: Effet de l'aspirine sur les paramètres de diffusion du PEG dans les biofilms*.

	B (10^{-3} s^{-1})	D ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	Pénétrabilité (%)
PEG seul** (1 ^{ère} diffusion)	4.8±1.4	9.6 ± 4.4	29±11
PEG + Aspirine	5.4±1.3	10.7 ± 4.3	26±9
PEG seul (2 ^e diffusion)	5.9±1.8	11.4 ± 4.0	27±10

*n = 3 ** Les valeurs obtenues avec le PEG seul sont spécifiques aux mesures effectuées lors des tests de détermination de l'effet de l'aspirine. Elles ne sont pas additionnées avec les valeurs de PEG seul obtenues lors des tests de validation de la méthode ni celles pour la détermination de l'effet de l'EDTA effectués sur les biofilms distincts.

3.2. Diffusion locale par SCF

Contrairement à la spectroscopie infrarouge qui a permis de mesurer le coefficient de diffusion globale du PEG dans le biofilm de *S. mutans*, la spectroscopie de corrélation de fluorescence est la méthode choisie pour la mesure du coefficient de diffusion locale (D). Le but de cette partie du projet a été de déterminer si, comme il a été le cas pour la diffusion globale, l'EDTA

a un effet sur la diffusion locale des molécules au sein du biofilm. La sonde utilisée dans ces mesures, le dextran 10k, est significativement différente du PEG 2k utilisé lors des expériences IR du fait d'une masse molaire plus grande et d'une plus grande rigidité des unités constituanes. Ces différences devront être prises en compte lors de l'interprétation des données. Plusieurs concentrations d'EDTA allant de 0.1 à 7.5 (m/v) % ont été utilisées dans l'étude de son effet sur la diffusion locale du dextran 10k.

Les valeurs du coefficient de diffusion du dextran 10k mesuré dans le biofilm de *S. mutans* en présence de l'EDTA à différentes concentrations, ainsi que celle de la référence, la solution sans EDTA, sont illustrées dans la figure 29. Une comparaison de ces coefficients de diffusion a été effectuée avec ceux mesurés dans une solution de référence en absence de biofilms, soit la solution aqueuse de PBS. D'après la figure 29, la valeur de D dans l'eau (D_w) est semblable avec celle de la littérature (Zhang *et al.*, 2011). En plus, on peut clairement observer l'effet des biofilms sur les mouvements locaux du dextran 10k. En effet, la valeur de D dans les biofilms (D_b) en absence de l'EDTA est deux fois plus faible par rapport à celle obtenue dans la solution de référence. Par contre l'EDTA n'a démontré aucun effet sur les mouvements locaux du dextran 10k, que ce soit dans le biofilm ou dans la solution de référence de tampon PBS (figures 29 et 30).

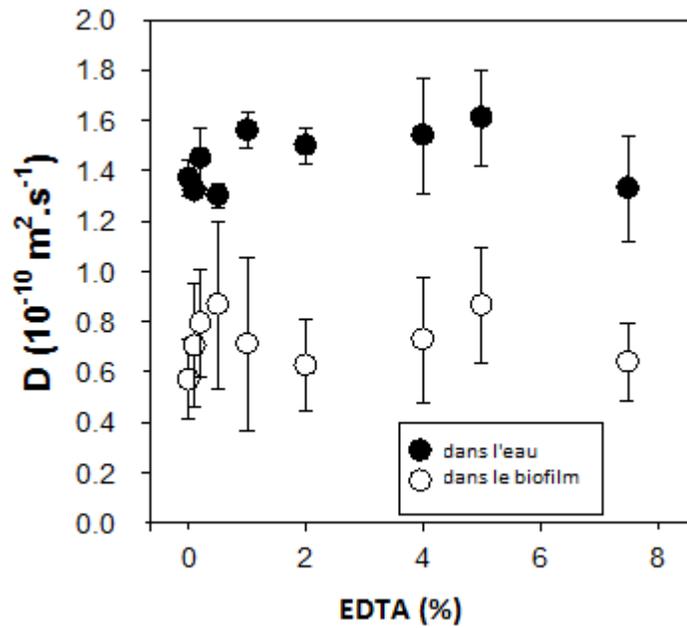


Figure 29: Coefficient de diffusion locale du dextran 10k en fonction du pourcentage de l'EDTA.

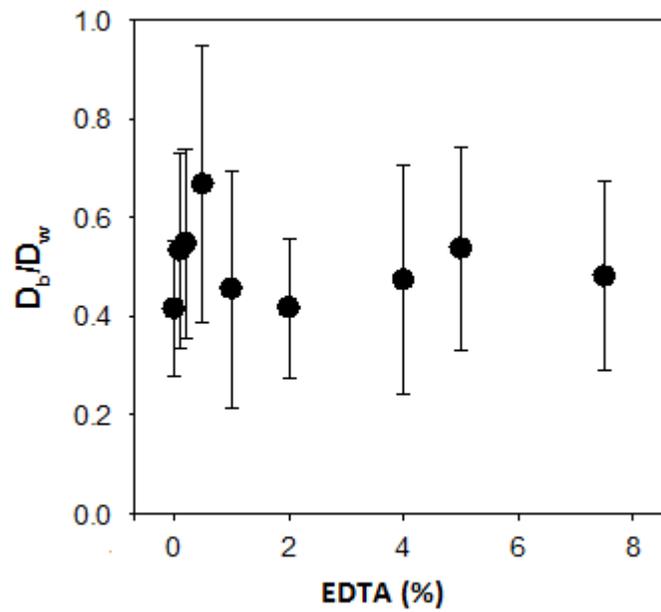


Figure 30: Coefficient de diffusion locale relatif du dextran 10k dans les biofilms de *S. mutans* en fonction du pourcentage de l'EDTA.

3.3. Test de viabilité sur les cellules du biofilm de *S. mutans*

Cette partie du projet a servi à vérifier l'influence de l'amélioration de la vitesse de diffusion et du pourcentage de pénétration des macromolécules à travers les biofilms provoquée par l'EDTA sur l'efficacité d'un antibiotique contre les biofilms de *S. mutans*. La pénicilline G (PenG) a été utilisée à une concentration finale de 25 g/L dans une solution tampon de PBS à pH 7.0. Le choix de cette concentration est justifié par le fait qu'elle provoque une réduction significative du taux de croissance des cellules des biofilms de *S. mutans* tout en laissant une marge à l'amélioration des propriétés bactéricides suite à l'effet de la combinaison avec l'EDTA (tableau 5); une mortalité trop élevée ne permettrait pas d'observer un potentiel effet additif ou synergique entre la PenG et l'EDTA. La concentration d'EDTA utilisée à cet effet est la concentration la plus élevée qui a démontré une propriété bactéricide négligeable sur les cellules des biofilms de *S. mutans*. Pour déterminer cette concentration, des tests de viabilité ont été effectués avec différentes concentrations d'EDTA. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Pourcentage de viabilité des cellules du biofilm de *S. mutans* (par rapport au contrôle) en fonction de la concentration d'EDTA.

	Concentration d'EDTA en (m/v) %		
	2.0	4.0	7.5
Essai 1 ^a	91.1	30.5	2.1
Essai 2 ^a	93.7	25.6	4.9
Essai 3 ^a	81.7	32.2	2.4
Essai 4 ^b	42.0	42.9	1.3
Moyenne	77 ± 22	33 ± 7	2 ± 2

Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance cellulaire par rapport au compte viable des cellules traités avec la solution de PBS à pH 7.0; *a*: la concentration des cellules bactérienne est de l'ordre de 10^7 CFU/ml; *b*: la concentration des cellules bactériennes est de l'ordre de 10^6 CFU/ml.

D'après les données du tableau 4 on peut observer une réduction significative de la viabilité des cellules bactériennes pour les concentrations de l'EDTA supérieures à 2 (m/v) %. Par contre lorsqu'on observe le pourcentage de croissance obtenu avec la concentration de 2 (m/v) %, deux tendances différentes ressortent. Premièrement, lorsque la concentration des cellules bactériennes utilisées pour le test d'inhibition est de l'ordre de 10^7 CFU/ml, une bonne

croissance est observée, avec une moyenne se trouvant à environ 90 % de croissance par rapport au contrôle. Par contre lorsque les biofilms produisent moins de cellules, soit une concentration de l'ordre de 10^6 CFU/ml, l'EDTA semble avoir un effet sur la croissance cellulaire, abaissant la moyenne à 77% par rapport au contrôle. Le fait qu'une faible diminution a été notée dans la croissance cellulaire lorsque le nombre de cellules est de l'ordre de 10^7 CFU/ml, la concentration de 2 (m/v) % d'EDTA a été retenue.

Quatre solutions ont été utilisées dans l'étude de l'effet de l'EDTA sur les propriétés antibactériennes de la PenG: une solution tampon PBS à pH 7.0 comme solution de contrôle, une solution d'EDTA 2 (m/v) %, une solution de la PenG 25 g/L ainsi qu'une solution de la PenG 25 g/L + EDTA 2 %. Toutes ces solutions ont été préparées dans un tampon PBS à pH 7.0. Les résultats des comptes viables des cellules des biofilms traités avec ces différentes solutions sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Pourcentage de viabilité des cellules du biofilm (par rapport au contrôle) de *S. mutans* traités avec les solutions d'EDTA et de PenG.

	Solutions		
	EDTA 2%	PenG 25 g/L	PenG + EDTA
Essai 1 ^a	89.6	37.7	19.7
Essai 2 ^a	94.4	36.0	15.6
Essai 3 ^b	45.2	47.2	6.4
Essai 4 ^b	56.0	46.5	9.3
Essai 5 ^b	49.3	28.3	6.8
Moyenne^c	67 ± 23	39 ± 8	12 ± 6

Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance cellulaire par rapport au compte viable des cellules traités avec la solution de PBS à pH 7.0. *a*: la concentration des cellules bactérienne est de l'ordre de 10^7 CFU/ml; *b*: la concentration des cellules bactériennes est de l'ordre de 10^6 CFU/ml. *c*: le p de l'ANOVA pour ces données est de 0.0002.

D'après les résultats du tableau 5, la solution de l'EDTA 2 (m/v) % se comporte de la même façon que lors du test de viabilité en fonction de la concentration d'EDTA (tableau 4). Lorsque la concentration des cellules est de l'ordre de 10^7 CFU/ml, les cellules gardent presque toute leur viabilité, alors que le taux de croissance diminue de moitié par rapport au contrôle lorsque les cellules sont 10 fois moins nombreuses (essais 3-5). La même tendance est observée dans l'effet du mélange PenG + EDTA, où le pourcentage de viabilité baisse lorsque la concentration cellulaire est de l'ordre de 10^6 CFU/ml. Par contre le taux de croissance n'est pas

influencé par la concentration des cellules lorsque le test d'inhibition est effectué avec la PenG seule. La comparaison du taux de croissance cellulaire entre la PenG et PenG + EDTA montre une nette diminution, chutant de 39 à 12% sous l'effet de l'EDTA, soit une amélioration de l'efficacité de l'antibiotique d'un facteur 3.

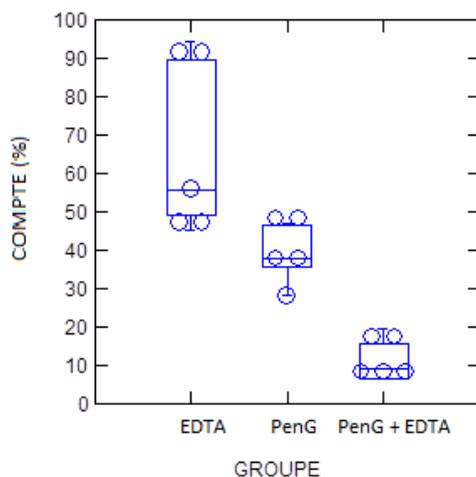


Figure 31 : Compte viable (en pourcentage) des cellules du biofilm de *S. mutans* traité avec les trois groupes de solutions. Les cercles représentent chacune des observations expérimentales, les diagrammes ou boîtes à moustaches représentées par les rectangles donnent une idée sur la dispersion des données obtenues dans deux conditions de concentration en cellules bactériennes (soit 10^6 et 10^7 CFU/ml) pour chaque groupe et la barre horizontale représente la médiane.

Les résultats du tableau 5 sont représentés graphiquement dans la figure 31. Dans cette figure, les cercles représentent chacune des observations expérimentales, les diagrammes ou boîtes à moustaches représentées par les rectangles donnent une idée sur la dispersion des données expérimentales obtenues dans deux conditions de concentration en cellules bactériennes (soit 10^6 et 10^7 CFU/ml) pour chaque groupe et la barre horizontale représente la médiane. On peut noter une plus grande dispersion des données obtenue avec la solution de l'EDTA, illustrée par une surface rectangulaire plus grande par rapport aux résultats des autres solutions. La plus grande dispersion des données avec la solution de l'EDTA se justifie par la différence de comportement de cette solution en fonction de la concentration de cellules testées, où les données en haut du rectangle représentent les données obtenues avec les solutions bactériennes de concentration de l'ordre de 10^7 CFU/ml. Par contre la dispersion est moins grande (meilleur

regroupement des données) pour la solution PenG + EDTA et l'effet de l'EDTA sur les propriétés antibiotiques de la PenG est nettement remarqué.

L'interprétation statistique des résultats obtenus par analyse de variance univariée (one way ANOVA : analysis of variance) a permis de déterminer les degrés de confiance (p) pour lesquels les moyennes entre les groupes sont statistiquement différentes. Cette analyse a donné une valeur de $p = 0.0002$ lorsque les trois groupes sont comparés entre eux. La comparaison entre chacun des groupes a donné les valeurs de $p = 0.0109$ pour la comparaison entre les groupes EDTA et PenG, $p = 0.0001$ pour la comparaison entre les groupes EDTA et PenG + EDTA et $p = 0.0114$ pour la comparaison entre les groupes PenG et PenG + EDTA. La valeur de p étant largement inférieure au niveau de signification ($p = 0,05$) dans tous les cas de comparaison, on pourrait donc conclure que l'EDTA permet d'améliorer significativement l'action antibactérienne de la PenG.

D'après la littérature, il peut exister une différence entre la viabilité des cellules bactériennes et leur cultivabilité (Renyé *et al.*, 2004); car le fait de ne pas observer une croissance sur un milieu solide de croissance ne signifie pas nécessairement la mort des cellules. Celles-ci peuvent encore garder leur viabilité tout en devenant non-cultivables. Il a donc été utile de vérifier si les effets remarqués sur les cellules des biofilms de *S. mutans* sont dus à la perte de leur aptitude à croître sur un milieu de culture solide ou tout simplement à l'effet bactéricide des solutions avec lesquelles elles ont été traitées. Pour ce faire, un test de viabilité (Backlight) a été effectué par microscopie à épifluorescence. Dans ce test, les cellules mortes sont colorées en rouge, alors que les cellules vivantes apparaissent en vert. Une diminution de taux de croissance due à une perte de cultivabilité et non à un effet bactéricide des solutions étudiées devrait faire ressortir les cellules colorées en vert. Les résultats du test de coloration sont présentés à la figure 32. Les figures 32A et 32B servent de témoin pour les cellules mortes et vivantes. Dans la figure 32A (biofilms traités à 121 °C à l'autoclave), les cellules apparaissent en rouge après le test de coloration, confirmant ainsi leur mort. Dans la figure 32B par contre (cellules traitées avec la solution servant de contrôle), les cellules restent vivantes et apparaissent en vert après le test de coloration.

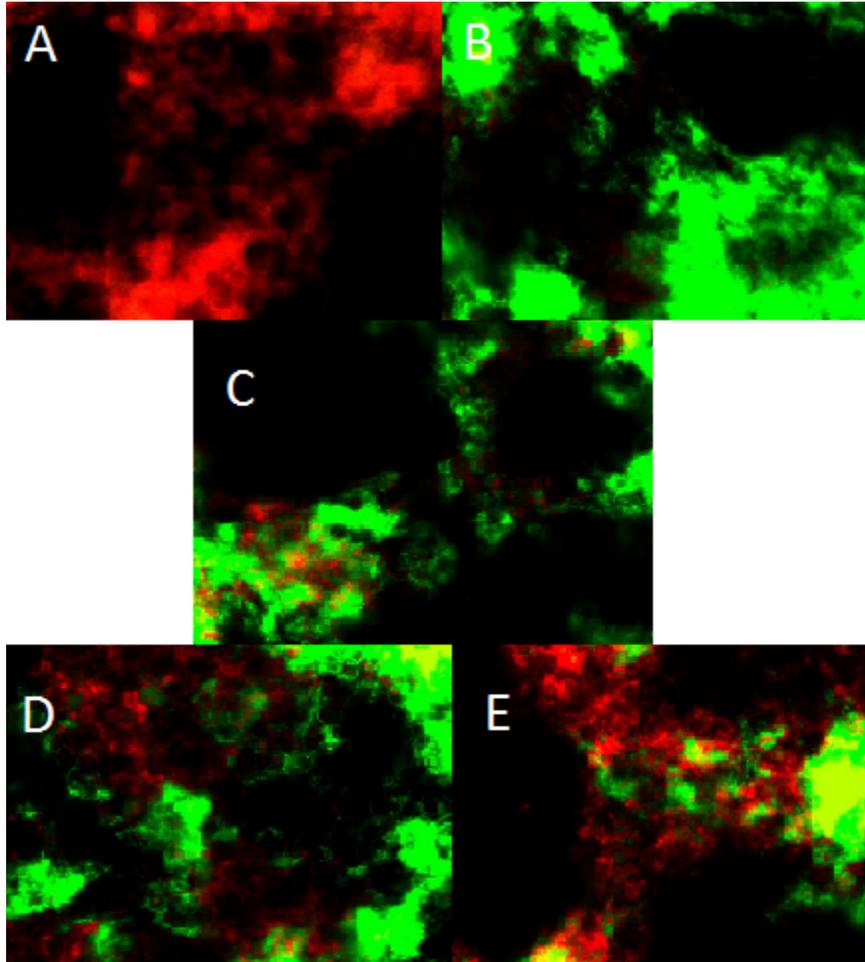


Figure 32 : Images du biofilm de *S. mutans* obtenues avec le test de coloration par microscopie à épifluorescence avec un microscope optique. (A) biofilm soumis au traitement à 125 °C dans l'autoclave, (B) biofilm traité avec la solution contrôle, PBS à pH 7.0, (C) biofilm traité avec l'EDTA 2 (m/v) %, (D) biofilm traité avec la solution de PenG 25 g/L, (E) biofilm traité avec la solution de PenG + EDTA. Les images ont été obtenues avec un objectif de grossissement 1000x.

On note une augmentation de la mortalité (exprimée par une augmentation de coloration en rouge) de la figure 32C à 32E, comparé au biofilm non traité. Le nombre de cellules colorées en rouge varie dans l'ordre suivant : (PenG +EDTA) > PenG > EDTA. L'observation des figures C à E met en évidence l'hétérogénéité des biofilms. L'imagerie par microscopie confocale à balayage (figure 33) donne une représentation plus claire de l'action bactéricide obtenue dans les figures 32C, 32D et 32E. Les couleurs verte et rouge étant représentatives de cellules vivantes et de cellules mortes, en conséquence, la couleur jaune est associée à une colocalisation de ces deux groupes de cellules. On remarque sur ces images une mortalité plus importante pour le biofilm traité avec la solution PenG + EDTA par rapport aux 2 autres biofilms. De plus, les régions les plus denses du biofilm semblent être plus atteintes par le traitement antibactérien pour la solution PenG + EDTA par rapport à la solution de la PenG seule. Cette observation est très importante car elle permet de mettre l'accent sur l'amélioration de transport de l'antibiotique dans les zones difficiles d'accès suite à l'effet de l'EDTA. A la lumière de cette observation, il est clair que la diminution de pourcentage de croissance des cellules des biofilms de *S. mutans* est le résultat de l'effet bactéricide des solutions avec lesquelles ces cellules ont été traitées. Et le plus faible pourcentage de croissance obtenu avec la combinaison PenG + EDTA permet de conclure que l'EDTA améliore l'effet bactéricide de cet antibiotique.

L'amélioration de l'effet antibiotique pourrait être une conséquence de la propriété de l'EDTA dans l'amélioration des propriétés de diffusion à travers le biofilm de *S. mutans* telles que mesurées par la méthode spectroscopique. Bien que la PenG ne soit pas une macromolécule ($M_m = 334 \text{ g/mol}$), il est proposé que sa diffusion soit affectée par l'encombrement stérique dans la matrice d'exopolysaccharides des biofilms. Cette affirmation est appuyée par la figure 33 qui montre une action plus marquée de la PenG dans les régions périphériques des biofilms lorsqu'elle est utilisée seule. L'amélioration de son action dans les régions les plus denses des biofilms lorsqu'elle est combinée avec l'EDTA est une indication que la barrière stérique pourrait être la cause de la perte de la diminution de son efficacité dans les biofilms.

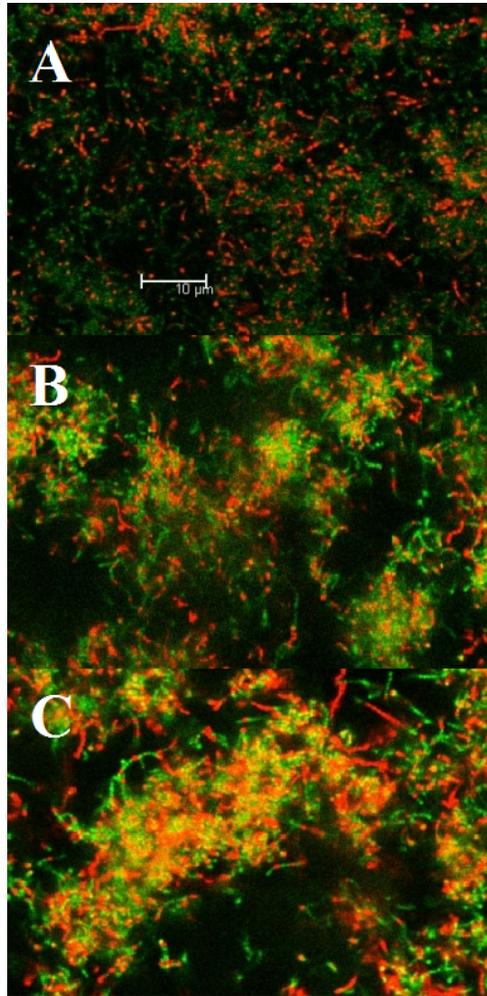


Figure 33 : Images du biofilm de *S. mutans* obtenu par microscopie confocale à balayage de laser. (A) biofilm traité uniquement avec l'EDTA 2 (m/v) %, (B) biofilm traité avec la solution de PenG 25 g/L, (C) biofilm traité avec la solution de PenG + EDTA.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1. Optimisation de la méthode

Le protocole pour la culture des biofilms de *S. mutans* à la surface du cristal ZnSe a déjà fait ses preuves dans notre équipe de recherche (Marcotte, 2004; Sandt *et al.*, 2007). Mais ce protocole, dans les conditions présentes, menait à l'obtention d'un biofilm dont l'épaisseur en-dessous de la zone d'entrée des liquides dans la cellule ATR était sensiblement plus petite (à l'œil nu) par rapport aux zones plus éloignées. L'épaisseur des biofilms est un paramètre important à maîtriser car le modèle mathématique utilisé dans le calcul du coefficient de diffusion suppose une épaisseur homogène sur toute l'étendue du biofilm (Crank, 1975). Même lorsque cette épaisseur semble homogène visuellement, il existe une hétérogénéité sur le plan microscopique. Il est donc important de produire un biofilm présentant une épaisseur la plus homogène que possible. A part ce facteur, il faut signaler également la lenteur dans la vitesse de couverture du cristal ZnSe par les biofilms avec le protocole existant. Le traitement du cristal au plasma ainsi que la diminution du débit d'écoulement des liquides pendant l'étape d'adhésion et de la croissance du biofilm se sont avérés efficaces en diminuant le temps de recouvrement complet du cristal et en favorisant la formation d'un biofilm plus homogène à l'œil nu.

Le nettoyage du cristal au plasma, par son action sur les propriétés du cristal, s'est avéré approprié lorsque la culture du biofilm s'effectue dans un système de turbulence comme il a été le cas dans ce projet. Il a été démontré que le plasma éliminait les impuretés que les solvants organiques comme l'éthanol et l'acétone étaient incapables de déloger sur la surface du cristal ZnSe (Ohno *et al.*; 1998a; Takagi *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 1991). Ceci dit, le seul nettoyage du cristal avec ces solvants pouvait laisser le cristal toujours couvert d'impuretés. La matière organique laissée par le nettoyage avec l'éthanol pouvait influencer les propriétés de ce dernier. Des études ont démontré que le traitement d'une surface solide au plasma permet aussi d'augmenter sa rugosité (Tuomanen *et al.*, 1986a; Tuomanen *et al.*, 1986b; Ohno *et al.* 1998b; Zakka *et al.*, 2007). On sait déjà qu'une surface rugueuse présente des irrégularités

microscopiques qui jouent un double rôle dans le processus de formation des biofilms (Newman et Wilson, 1999). En premier lieu, les irrégularités offrent une surface supplémentaire d'attache aux cellules microbiennes, leur permettant d'atteindre une forte densité plus rapidement. En second lieu, l'existence des irrégularités à la surface solide offre aux cellules une protection contre les forces de cisaillement (voir plus bas) lorsque la croissance des biofilms s'effectue dans un système de turbulence. Les cellules ainsi protégées de ces contraintes imposées par le mouvement des liquides sont plus aptes à adhérer au cristal et à atteindre la densité nécessaire pour déclencher le processus de *quorum sensing*, une étape déterminante dans le processus de formation des biofilms (Roberts *et al.*, 1999). Ces éléments sont proposés comme sources de la différence observée dans la densité des sucres constituant la matrice d'exopolysaccharides sur le cristal traité au plasma par rapport aux résultats obtenus lors que le nettoyage est effectué uniquement avec de l'éthanol. Une densité des polysaccharides plus de deux fois plus élevée obtenue sur le cristal traité au plasma montre assez clairement son impact sur le traitement du cristal. Mais il faut signaler que le plasma peut conduire à une modification des propriétés optiques du cristal ZnSe (Takagi *et al.*, 2010), en particulier lorsqu'on se trouve dans la gamme du spectre ultraviolet. Par contre, nous n'avons observé aucune différence dans la zone de l'infrarouge moyen. Le nettoyage du cristal ZnSe au plasma est donc à recommander lors de la culture des biofilms à la surface de ce cristal afin de faire la caractérisation des biofilms formés ainsi que celle des molécules y diffusant par spectrophotométrie infrarouge.

Le débit a montré une influence non négligeable lorsque la culture du biofilm est effectuée dans un système de turbulence, où les liquides sont introduits dans la cellule ATR. Son effet s'est manifesté de deux façons d'après les résultats obtenus, soit dans la diminution du temps de recouvrement du cristal par les biofilms ainsi que dans la densité de ceux-ci. Le recouvrement du cristal a été complet lorsque l'inoculum et le milieu de culture ont été introduits à un débit de 0.3 ml/min pour une durée de 18 h (obtention d'un plateau pour l'évolution de la quantité de sucre – voir Fig. 10) alors qu'un recouvrement incomplet a été observé avec un débit de 0.5 ml/min. La vélocité des liquides a montré un effet sur la vitesse de propagation des biofilms. Plus la vélocité était élevée, moins les biofilms se propageaient rapidement sur la surface solide. Cette observation corrobore les résultats de la littérature, car il a été rapporté que le taux de croissance des biofilms varie de façon inversement proportionnelle à la force de turbulences

près du biofilm (Brading, 1996). L'utilisation d'un débit moins grand permet donc de diminuer les turbulences près de la zone d'entrée des liquides, réduisant ainsi l'effet négatif du flot sur la vitesse de propagation des biofilms et de ce fait, sur le temps de couverture du cristal par le biofilm. Quant à la densité maximale des sucres de la matrice d'EPS, elle est plus grande avec le débit le plus élevé. Cette différence peut être attribuable à différents facteurs. D'abord, il y a le fait qu'un plus grand flot permet d'apporter plus de nutriments aux cellules microbiennes, favorisant ainsi la production de plus de biofilms. Un rapport positif entre l'augmentation de flot et la densité des biofilms produits a d'ailleurs été rapporté (Zhang *et al.*, 2011). Dans le même ordre d'idée, Sandt *et al.* ont démontré que la densité des biofilms de *S. mutans* augmente proportionnellement avec le pourcentage de sucrose dans le milieu de culture (Sandt *et al.*, 2007). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle une plus grande disponibilité des nutriments favoriserait l'obtention des biofilms plus denses, car un meilleur apport de sucrose se traduit par une plus grande production des EPS. Outre un plus grand apport des nutriments, la vitesse d'entrée des liquides dans la cellule ATR peut également influencer les propriétés des biofilms formés. Parmi celles-ci on peut citer l'architecture des biofilms. En effet, la morphologie des biofilms est influencée par l'existence des forces hydrodynamiques dans le système dans lequel les biofilms sont cultivés (Stoodley *et al.*, 1999a). Il a été démontré qu'il existe une différence majeure dans la morphologie des biofilms cultivés dans divers flots (Stoodley *et al.*, 1998, 1999b, 1999c). Un exemple extrême de ce phénomène est la morphologie des biofilms cultivés dans un système statique par rapport au système dynamique. Dans le dernier cas, la présence des turbulences dues aux mouvements des liquides produit des forces de cisaillement. Ces forces ont pour effet d'entraîner les biofilms dans le sens d'écoulement des liquides leur donnant ainsi une morphologie allongée ou filiforme (Stoodley *et al.*, 1998). Par contre, dans un système statique (i.e. sans turbulences et en l'absence des forces de cisaillement), les biofilms se développent en amas ou flocons arrondis. La forme des microcolonies, selon les conditions de cultures (turbulences ou non) pourrait expliquer la différence de densités observées. Lorsque les biofilms croissent sous une structure filiforme, il existe un ratio surface sur volume élevé, favorisant ainsi le transfert de masse, ce qui conduit à l'obtention des biofilms de densité plus élevée comparé à ceux cultivés dans un système statique (Siegrist et Gujer, 1985). Ces éléments pourraient justifier l'obtention des biofilms de densité plus élevée avec le flot de 0.5 ml/min par rapport à celui de 0.3 ml/min. Dans ce dernier cas, les forces

hydrodynamiques étant moins grandes, l'effet d'élongation peut s'avérer moins prononcé et donc produire un ratio de surface/volume moins grand. Nos résultats corroborent donc ceux de la littérature, qui rapportent l'obtention d'un biofilm de densité plus grande sous l'effet des forces hydrodynamiques (Vieira et Melo, 1999).

Selon l'équation 2, le coefficient de diffusion varie proportionnellement au carré de l'épaisseur du biofilm. Ce facteur devait être contrôlé aussi bien que possible afin de limiter l'introduction d'artefacts dans la comparaison des propriétés de diffusion du PEG en absence et sous l'effet des agents perturbateurs. En se servant du milieu de culture comme matrice dans la préparation des solutions à faire diffuser ainsi que comme solution de lavage des biofilms entre les diffusions, il y a un risque de voir la croissance des biofilms se poursuivre. Le remplacement du milieu de culture par le tampon PBS s'est avéré une très bonne approche afin de maintenir non seulement l'épaisseur mais aussi la densité des biofilms constantes de la première jusqu'à la dernière diffusion, en passant par les lavages. La mesure de la densité des sucres du biofilm avant la première diffusion (après le remplacement du milieu de culture par le PBS) et à la fin de la dernière diffusion (après lavage avec le tampon PBS) a donné une valeur à peu près constante, confirmant que toutes les diffusions effectuées sur le même biofilm ont été faites dans des conditions similaires.

4.2. Effet des agents perturbateurs

4.2.1. Effet de l'aspirine

L'utilisation de l'aspirine en tant qu'agent potentiellement perturbateur de structure des biofilms est basée sur son effet sur la porosité de la structure des biofilms de *Candida albicans* (Alem *et al.*, 2004). Par contre, notre étude ne montre aucun changement dans les propriétés de transport du PEG à travers les biofilms de *S. mutans*. Nous avons cependant montré, à partir de sa signature spectrale, que l'aspirine pénètre à l'intérieur du biofilm. Nous avons bien établi la pénétration de l'aspirine mais aussi son absence d'impact sur la diffusion du PEG 2k. Ce résultat

pourrait s'expliquer par au moins deux raisons. D'un côté, il se peut que l'aspirine ne produise pas le même effet sur les biofilms de *S. mutans* que sur ceux de *Candida albicans*. D'autre part, il est possible que la perturbation de la structure du biofilm ne soit pas assez significative pour influencer les propriétés de transport du PEG 2k à travers ces biofilms. Si c'était le cas, l'utilisation d'une molécule de plus petite taille pour sonder le changement de structure pourrait être plus appropriée. Cette hypothèse reste à vérifier.

4.2.2. Effet de l'EDTA

La mesure du coefficient de diffusion globale du PEG 2k effectuée sur les biofilms de *S. mutans* a démontré une limitation dans le transport de cette macromolécule par rapport à sa diffusion dans l'eau. La valeur de ce coefficient de diffusion dans le biofilm est du même ordre que celle rapportée dans la littérature (Marcotte *et al.*, 2004). La diffusion du PEG 2k en présence de l'EDTA a eu comme effet l'amélioration de ses propriétés de diffusion, avec une augmentation de son coefficient de diffusion d'un facteur 3. A la fin de la diffusion, le pourcentage de PEG 2k à la base du cristal était presque deux fois plus élevé en présence de l'EDTA par rapport à lorsqu'il a diffusé seul. Cette dernière observation est très importante dans l'interprétation des résultats sur l'amélioration des propriétés de transport du PEG à travers le biofilm. En effet, l'augmentation de la vitesse de pénétration du PEG 2k dans le biofilm pourrait être justifiée comme la conséquence d'un lavage incomplet du PEG après la première diffusion, car la disparition de cette macromolécule dans la zone évanescente n'est pas synonyme de son élimination complète dans les autres régions du biofilm. S'il en était ainsi, la seconde diffusion du PEG se ferait plus rapidement par rapport à la première, qu'il diffuse seul ou en présence de l'EDTA. Par contre, quoi que plus rapide, sa concentration atteindrait le même pourcentage de pénétration que lors de sa première diffusion. Dans notre cas, l'augmentation de la concentration de cette macromolécule dans la zone évanescente en présence de l'EDTA est une confirmation de l'influence de cet agent perturbateur dans l'amélioration des propriétés de transport du PEG.

Il a été rapporté que l'EDTA augmente la taille des pores des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* de 12%, tout en diminuant la distance de diffusion (i.e. distance parcourue par les molécules pour diffuser du point A au point B) de moitié (Yayin *et al.*, 2009). En plus, en étudiant la diffusion des dextrans à travers les biofilms de *Pseudomonas fluorescens*, Lawrence *et al.* ont rapporté que l'EDTA entraînait particulièrement de plus grandes valeurs de coefficients de diffusion dans les régions des biofilms possédant les pores et les canaux d'eau (Lawrence *et al.*, 1994). Dans les biofilms, les pores sont décrits comme la distance moyenne entre les polymères formant la matrice des EPS (Birmingham *et al.*, 1995). On sait déjà que les cations bivalents participent à la structure tridimensionnelle des biofilms en reliant les différents groupements des EPS par des liens électrostatiques. L'augmentation de la taille des pores dans les biofilms serait donc la conséquence de la complexation des cations bivalents par l'EDTA. Ceci justifie l'augmentation de la pénétrabilité du biofilm et celle du coefficient de diffusion des macromolécules diffusées. Par contre, bien que significative, l'augmentation de la diffusion du PEG 2k à travers le biofilm de *S. mutans* n'est pas drastique. Cette modeste contribution de l'effet de l'EDTA sur les propriétés de diffusion du PEG 2k peut être liée à la nature des EPS constituant la matrice du biofilm de *S. mutans*. En effet, les sucres constituant les EPS des biofilms de *S. mutans* sont majoritairement constitués de glucanes, qui sont des polymères neutres (Sutherland, 1999). La contribution des cations bivalents dans la structure de ce biofilm serait donc limitée, corroborant ainsi les observations rapportées par d'autres auteurs (Cerning *et al.*, 1990). L'étude des interactions existant entre les polysaccharides constituant la matrice du biofilm de *S. mutans* a conduit à la conclusion selon laquelle les interactions de type liaisons hydrogène seraient dominantes au sein de ce réseau de macromolécules (Keltrup *et al.*, 1972). Ces auteurs ont prouvé que lorsque les liaisons hydrogène sont détruites dans le biofilm de *S. mutans*, il est impossible de les reformer sans l'ajout de cations bivalents. Ce phénomène a été expliqué par le fait que la présence des cations bivalents permet de neutraliser les répulsions entre les charges négatives (Keltrup *et al.*, 1972) tout en permettant au réseau des polysaccharides d'acquiescer une conformation optimale pour la formation des ponts hydrogène. Ceci démontre qu'en dépit du caractère neutre des glucanes dans le biofilm de *S. mutans*, il existe des liaisons électrostatiques qui, quoi qu'en faible proportion, semblent jouer un rôle incontournable dans l'organisation de la structure tridimensionnelle de ces biofilms. Ceci expliquerait l'effet (modeste mais significatif) de l'EDTA sur les propriétés de diffusion du PEG

dans les biofilms de *S. mutans*. Dans cette optique, la combinaison de l'EDTA avec un composé possédant la propriété de former de fortes liaisons hydrogène serait une option sérieuse à considérer dans la lutte contre la résistance des biofilms de *S. mutans* aux agents biocides. Le dit composé, de par sa capacité à former les liens hydrogène, briserait ceux qui existent entre les polysaccharides de la matrice des EPS et déformerait la structure tridimensionnelle du biofilms déjà fragilisée par la chélation des ions divalents par l'EDTA.

Le coefficient de diffusion locale, caractérisée par les mouvements browniens des molécules, a été mesuré par spectroscopie de corrélation de fluorescence (SCF). Le dextran 10k a été utilisé comme sonde. Selon les résultats obtenus, le coefficient de diffusion locale du dextran 10k dans le biofilm de *S. mutans* n'est pas influencé par des concentrations d'EDTA allant de 0.1 à 7.5 (m/v) %, contrairement à ce qui a été observé pour la diffusion globale mesurée par IR-ATR. Certains paramètres peuvent être à l'origine de cette différence. Tout d'abord la grosseur de la sonde utilisée dans la mesure du coefficient de diffusion est différente de celle employée en IR-ATR. La grosseur de la molécule diffusante peut influencer les propriétés de diffusion d'une sonde à travers les biofilms et ce paramètre peut contribuer à la différence d'effet observée de l'EDTA sur le coefficient de diffusion locale et globale. Le dextran 10k a été la sonde utilisée pour la mesure, ce qui représente une masse moléculaire 5 fois plus grande que le PEG 2k utilisé dans la mesure du coefficient de diffusion globale. Zhang *et al.* (2011) ont effectué des mesures de diffusion locale de dextran de différentes masses moléculaires (de 3k à 2000k) sur le biofilm de *S. mutans*. Ils ont rapporté une diminution du coefficient de diffusion locale ainsi qu'une diminution du coefficient de diffusion relatif avec l'augmentation de la taille du dextran. Ceci corrobore d'autres résultats de la littérature qui montrent aussi que plus les molécules sont grosses, plus elles sont sensibles à la barrière physique qu'est la matrice extracellulaire du biofilm (Marcotte *et al.*, 2004). Avec leurs résultats, Zhang *et al.* (2011) ont démontré que le coefficient de diffusion locale dans le biofilm est réduit d'un facteur 1.5, indistinctement pour le dextran 10k et le dextran 3k (celui dont la masse moléculaire s'approche du PEG 2k). Donc, en se basant strictement sur la taille des sondes, dextran 10k et PEG 2k devraient avoir des comportements voisins ou, s'il y a une différence, dextran 10k devrait être une sonde plus sensible à l'effet de la barrière imposée par le réseau de polymères constituant le biofilm. Dans ce cas, le dextran 10k, plus gros, peut être plus influencé par le réseau de gel du biofilm et ceci

pourrait faire en sorte que les perturbations causées par l'EDTA soient moins ressenties par le dextran 10k par rapport à un dextran de masse molaire plus faible. La taille du dextran 10k fait qu'il rencontre plus d'obstacles dans ses mouvements par rapport au dextran 3k (Zhang *et al.*, 2011), ce qui devrait le rendre moins sensible à l'effet de l'EDTA; étant donné que l'effet de l'EDTA sur la diffusion du PEG 2k à travers le biofilm de *S. mutans* est très limité (quoique significatif), l'augmentation de la taille de la sonde ne peut que l'atténuer. Il est important de souligner que si l'augmentation de la taille de la sonde s'accompagne d'une diminution du coefficient de diffusion locale relatif (en SCF), la même tendance a été rapportée pour le coefficient de diffusion globale avec les molécules de PEG en IR (Marcotte *et al.*, 2004). Par contre, pour ce type de diffusion, une tendance inverse est rapportée pour les plus grosses molécules. Pour expliquer ce comportement, il est proposé que la distribution des sondes dans le biofilm ne se fait pas de la même manière: les plus grosses molécules se retrouvent dans les canaux d'eau où les propriétés de diffusion sont plus proches de celles dans l'eau. Dans ce cas, plus la molécule est grosse, plus sa diffusion relative (par rapport à celle dans l'eau) augmente. Ce comportement est le contraire de ce qui est rapporté pour le coefficient de diffusion locale. Une autre étude met de l'avant cette hypothèse en incluant un effet de la nature des biofilms. Birmingham *et al.* (1995) rapportent une diminution du coefficient de diffusion relatif avec l'augmentation de la masse moléculaire dans les biofilms moins denses et plus homogènes. Par contre, dans les biofilms plus denses, les auteurs proposent que les plus grosses molécules diffusent préférentiellement dans les canaux d'eau (ou water channels) (Birmingham *et al.*, 1995). Ainsi, elles voient leur diffusion moins affectée par la présence de barrières stériques et leur coefficient de diffusion relatif se voit ainsi augmenté. Cette hypothèse pourrait expliquer la différence observée dans la variation des coefficients observés dans la diffusion globale par rapport à la diffusion locale puisque le PEG utilisé pour la diffusion globale est plus petit que le dextran utilisé dans la diffusion locale. Ainsi le PEG pourrait pénétrer dans des endroits plus denses en biomasse et, en conséquence, voir son coefficient de diffusion plus affecté. En présence d'EDTA, les régions denses en biomasse pourraient subir une reconfiguration plus significative que celle affectant les canaux d'eau déjà peu encombrés par la biomasse. De cette manière, la diffusion du PEG 2k plus petit serait plus affectée par la présence d'EDTA dans le biofilm que celle du dextran 10k. Outre l'effet de la taille de la molécule, la nature des sondes diffusantes peut jouer un rôle dans la sensibilité à la présence à l'EDTA. Les molécules de PEG

utilisées en spectroscopie infrarouge sont plus flexibles que celles du dextran, dont les unités monomères sont plus rigides. Cette différence structurale peut contribuer à une sensibilité différente aux changements de structure du biofilms apportés par l'EDTA.

La différence dans les tendances observées entre les deux techniques pourrait aussi être le fait de la différence dans l'échelle des mesures entre la technique de l'infrarouge et celle de la SCF. Il se pourrait que l'effet de l'EDTA soit plus grand sur les régions du biofilm inaccessibles à la sonde fluorescente et qu'il puisse affecter des structures qui ont un impact plus prononcé sur la diffusion globale, donc plus à longue échelle (plusieurs dizaines de μm) qu'à courte échelle (plus ou moins $1 \mu\text{m}$) pour SCF. Pour appuyer cette hypothèse, nos résultats montrent que le coefficient relatif de diffusion locale (D_b / D_w) du dextran 10k dans les biofilms est deux fois plus élevé ($D_{rel} = 0.4$) (voir la fig. 30) par rapport à celui de la diffusion globale ($D_{rel} = 0.2$) (Marcotte *et al.*, 2004) pour le PEG mesuré par la méthode d'IR-ATR. Cette observation suggère que la diffusion locale est deux fois moins sensible à la barrière physique imposée par la matrice des biofilms. Ce paramètre est probablement associé aux effets de la taille et de la nature des molécules (flexibilité du PEG et rigidité du dextran) discutés plus haut. Comme elle est moins sensible à la présence de la matrice du biofilm, la diffusion locale, par rapport à la diffusion globale, pourrait moins sentir l'effet de l'EDTA sur la structure du biofilm et ainsi rendre cet impact sous la limite de détection, surtout lorsqu'on sait que son effet sur la diffusion globale du PEG 2k dans le biofilm de *S. mutans* n'est pas drastique.

Des tests microbiologiques ont été effectués sur le biofilm de *S. mutans* (en absence et en présence de l'EDTA) afin de vérifier si l'amélioration des propriétés de transport des macromolécules à travers les biofilms de *S. mutans* causée par l'EDTA, telle que détectée par spectroscopie IR, pouvait avoir une conséquence dans l'efficacité des agents biocides contre ces biofilms. Les résultats obtenus montrent que la PenG est plus de 2,5 fois plus efficace contre les cellules des biofilms de *S. mutans* lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec l'EDTA par rapport à lorsqu'elle est employée seule. L'imagerie par microscopie à épifluorescence et microscopie à balayage de laser a permis de noter que l'action de la PenG lorsqu'elle est employée seule (sans EDTA) est efficace uniquement dans les zones les moins denses du biofilm de *S. mutans*. Cependant, sa combinaison avec l'EDTA a permis d'obtenir un taux de mortalité des

cellules bactériennes plus élevée dans les régions les plus denses du biofilm. Ce résultat est important dans l'étude de l'effet de l'EDTA car il suggère que l'amélioration de l'effet biocide de la PenG en présence de l'EDTA est due à une meilleure action dans les régions les plus denses du biofilm. Le fait d'obtenir plus de bactéries mortes dans les régions les plus denses du biofilm en présence de l'EDTA peut être le résultat de l'effet de ce dernier sur les propriétés de transport des molécules dans les biofilms comme il a été démontré avec le PEG 2k. Sous l'effet de sa combinaison avec l'EDTA, la PenG diffuse plus vite et son pourcentage de pénétration au sein des cellules agrégées est plus élevé, rendant donc l'antibiotique plus efficace. D'après notre étude, le coefficient de diffusion du PEG 2k dans le biofilm en présence d'EDTA est presque trois fois plus grand que celui obtenu pour les biofilms non perturbés par l'EDTA. De plus, la concentration du PEG à la base du biofilm atteint 47% de la concentration de la solution diffusante en présence d'EDTA, comparé à 27% dans les biofilms sans EDTA. Ceci indique que la restriction des mouvements des analytes dans les biofilms est partiellement levée en présence d'EDTA et que sous l'effet de l'EDTA, les cellules bactériennes dans le biofilm sont donc exposées à une plus grande concentration d'antibiotique. Des résultats complémentaires du groupe montrent que le taux de mortalité des cellules bactériennes dans le biofilm augmente d'un facteur 4 lorsque la concentration de PenG est doublée (données non montrées). Ce résultat est passablement en accord avec notre observation que l'EDTA augmente la concentration de PenG d'un facteur environ 1.7 dans le biofilm, ce qui ferait environ doubler son pouvoir bactéricide. Comme indiqué par Gulot *et al.* (2002), la valeur du coefficient de diffusion des macromolécules dans les régions les moins denses du biofilm est proche de celui mesuré dans l'eau (en absence du biofilm). Ainsi, même sans EDTA, la PenG pourrait avoir un effet en périphérie des microcolonies, où la densité de biomasse est moindre, comme observée par microscopie de fluorescence. Le concept de la perturbation de la structure du biofilm afin d'augmenter le pouvoir d'éradication des biofilms par des agents antibactériens a donc été validé par le couple PenG/EDTA sur les biofilms de *S. mutans*.

CHAPITRE 5. CONCLUSION

L'étude de la diffusion des macromolécules dans les biofilms requière une bonne couverture du cristal par le biofilm afin d'éviter une diffusion instantanée des molécules étudiées. C'est pour cette raison qu'une optimisation de la méthode était requise afin de déterminer les paramètres permettant d'aboutir à une couverture complète et le plus uniforme possible sur toute l'étendue du cristal. Cette optimisation a démontré qu'un nettoyage préalable est requis afin de garantir une bonne adhésion des biofilms sur le support solide. De même, il est important de contrôler la force des turbulences lors de l'entrée du milieu de culture dans la cellule ATR durant la période de croissance en contrôlant le débit. Ces deux paramètres doivent être pris en compte lors de la culture des biofilms sur un cristal ZnSe dans une cellule ATR.

L'hypothèse de la perturbation de la structure des biofilms par l'EDTA suite à la chélation des ions bivalents a été vérifiée. L'emploi de l'EDTA a amélioré les propriétés de diffusion du PEG dans le biofilm de *S. mutans*. L'ordre de grandeur de l'augmentation de la vitesse de diffusion, du coefficient de diffusion ainsi que du pourcentage de pénétration reflète probablement la grandeur limitée de la contribution des interactions électrostatiques associées aux ions divalents dans la structure tridimensionnelle des biofilms de *S. mutans*. Considérant l'importance de la contribution des liaisons hydrogène dans la structure tridimensionnelle des biofilms, en particulier ceux de *S. mutans*, l'association de l'EDTA avec une molécule possédant la propriété de briser des liaisons hydrogène est une bonne avenue à explorer dans l'étude de la lutte contre la résistance des biofilms bactériens aux agents biocides. Le fait d'obtenir des résultats positifs avec l'EDTA est encourageant et laisse supposer qu'en détruisant les liaisons hydrogène, pourrait aboutir à des résultats beaucoup plus significatifs. Cette option devrait être sérieusement considérée dans les études futures. L'emploi d'une sonde plus grosse que celle utilisée en spectroscopie infrarouge n'a pas permis d'effectuer une comparaison de l'effet observé par FCS. Il serait intéressant d'étudier l'effet d'agents perturbateurs de la structure du biofilm par les deux techniques, pour des sondes couvrant toute une gamme de tailles de manière à pouvoir mieux détailler l'effet de ces agents sur les propriétés de transport dans les biofilms.

Le recours aux tests microbiologiques a permis de supporter l'effet de l'EDTA observé par diffusion globale puisque cet agent a amélioré l'efficacité de la PenG sur les biofilms. Ces résultats permettent de conclure que la combinaison de l'antibiotique avec un agent perturbateur de la structure des biofilms est à considérer dans la lutte contre la résistance des biofilms de *S. mutans* aux biocides. Le fait d'avoir obtenu un effet modeste de l'amélioration de l'efficacité de l'antibiotique en présence de l'EDTA pour *S. mutans* comparé à son effet sur les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* démontre encore une fois l'importance de la nature des interactions régissant la stabilité des biofilms dans le type d'agent perturbateur à utiliser.

Quant à l'aspirine, le manque d'amélioration sur les propriétés de diffusion du PEG nous pousse à conclure que, soit l'aspirine ne produit pas le même effet sur les biofilms de *S. mutans* que celui observé avec les biofilms de *C. albicans*, soit que cette perturbation n'est pas assez significative pour modifier les propriétés de diffusion des macromolécules à travers ces biofilms.

En conclusion, ce travail jette de nouvelles bases pour l'amélioration de l'efficacité des agents biocides basée sur une amélioration de ses propriétés de diffusion à l'intérieur des biofilms bactériens.

RÉFÉRENCES

- Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., Chan, F. (2009). "Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Otolaryngol Head Neck Surg **141**: 114-118.
- Alem, M. A., Douglas, L. J. (2004). "Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **48**: 41-47.
- Allison, D.G., Sutherland, I. W. (1987). "The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh water bacteria." J Gen Microbiol **133**: 1319-1327.
- Allison, D. G., Matthews, M. J. (1992). "Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*." J Appl Bacteriol **73**: 484-488.
- Allison, D. G., Gilbert, P. (1995). "Modification by surface association of antimicrobial susceptibility of bacterial populations." J Ind Microbiol **15**: 311-317.
- Allison, D. G. (2003). "The biofilm matrix." Biofouling **19**: 139-150.
- Aragon, S. R., Pecora, R. (1975). "Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics." J Chem Phys **64**: 1791-1803.
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W. W. (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." Biophys J **16**: 1055-1069.
- Barbeau, J. (1993). "Microbiologie et pathogenèse des infections bucco – faciales." Université de Montréal, Canada.
- Bechmann, R.T., Eduvean, R. G. C. (2006). "AFM Study of the colonization of stainless steel by *Aquabacterium commune*." Int Biodeter Biodegr **58**: 3-4.
- Beuling, E. E., van Dusschoten, D., Lens, P., van den Heuvel, J. C., Van As, H., Ottengraf, S. P. P. (1998). "Characterization of the diffusive properties of biofilms using pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance." Biotechnol Bioeng **60**:283–291.
- Birmingham, J. J., Hughes, N. P., Treloar, R. (1995). "Diffusion and binding measurements within oral biofilms using fluorescence photobleaching recovery methods." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **350**: 325-343.

- Bishop, P. L., Zhang, T. C., Fu, Y. C. (1995). "Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass-transport on biodegradation processes." Water Sci Technol **31**:143–152.
- Blonk, J. C. G., Van Alst, A. D. H., Birmingham, J. J. (1993). "Fluorescence photobleaching recovery in the confocal scanning light microscope." J Microsc **169**: 363-374.
- Brading, M. G. (1996). "The influence of fluid dynamics and surface material on pure and binary culture biofilms." thèse de Ph.D., University of Exeter.
- Brock, R., Hink, M. A., Jovin, T. M. (1998). "Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence." Biophys J **75**: 2547-2557.
- Brook, I. (2005). "The role of bacteria in chronic rhinosinusitis." Otolaryngol Clin North Am **38**: 1171-1192.
- Brown, M. R., Allison, D. G., Gilbert, P. (1988). "Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?" J Antimicrob Chemother **22**: 777-780.
- Bryers, J. D., Drummond, F. (1998). "Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)." Biotechnol Bioeng **60**: 462-473.
- Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lawrence, J. R. (1992a). "Confocal laser microscopy and computer image analysis of microbial ecology." Adv Microb Ecol **12**: 1-67.
- Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lawrence, J. R. (1992b). "Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion by using scanning confocal laser microscopy." J Microbiol Methods **15**: 249-261.
- Cerning, J. (1990). "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria." FEMS Microbiol Rev **7**: 113-130.
- Chiu, A. G., Palmer, J. N., Woodworth, B. A., Doghramji, L., Cohen, M. B., Prince, A., Cohen, N. A. (2008). "Baby shampoo nasal irrigations for the symptomatic post-functional endoscopic sinus surgery patient." Am J Rhinol **22**: 34-37.
- Cochran, W. L., McFeters, G. A., Stewart, P. S. (2000). "Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine." J Appl Microbiol **88**: 22-30.
- Costerton, J. W. (1977). "Cell envelope as a barrier to antibiotics." Am Soc Microbiol 151-157.
- Costerton, J. W., Marriet, J. (1983). "The role of the bacterial glycocalyx in resistance to antimicrobial agents." Dans "Role of the Envelope in the Survival of Bacteria in Infections." Academic Press, U.K.

Costerton, J. W., Marie, T. J., Cheng, K.J. (1985). "Phenomena of bacteria adhesion." Plenum, USA.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., de Beer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994). "Biofilms, the customized microniche." J Bacteriol **176**: 2137-2142.

Costerton, J. W. (1997). "Cleaning techniques for medical devices: biofilms." Biomed Instrum Technol **31**: 222-226.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999a). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**: 1318-1322.

Costerton, J.W., Cook, G., Lamont, R. (1999b). "The community architecture of biofilms: Dynamics structures and mechanisms." Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.

Crank, J. (1975). "The mathematics of diffusion", 2nd edition, Clarendon Press, United Kingdom.

Cross, S. E., Kreth, J., Zhu, L., Sullivan, R., Shi, W., Qi, F., Gimzewski, J. K. (2007). "Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions." Microbiology **153**: 3124-3132.

Darouiche, R. O., Smith, J. A. Jr., Hanna, H., Dhabuwala, C. B., Steiner, M. S., Babaian, R. J., Boone, T. B., Scardino, P. T., Thornby, J. I., Raad, II (1999). "Efficacy of antimicrobial-impregnated bladder catheters in reducing catheter-associated bacteriuria: a prospective, randomized, multicenter clinical trial." Urology **54**: 976-981.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg, E. P. (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science **280** 295-298.

de Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P. S. (1994a). "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection." Appl Environ Microbiol **60**: 4339-4344.

de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z. (1994b). "Liquid flow in heterogeneous biofilms." Biotechnol Bioeng **44**: 636-641.

de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z. (1997). "Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy." Biotechnol Bioeng **53**: 151-158.

- Desrosiers, M. (2007). "Effectiveness of topical antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro." Am J Rhinol **21**: 149-153.
- Dobson, A., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2011). "Impact of the broad-spectrum antimicrobial peptide, lactacin 3147, on *Streptococcus mutans* growing in a biofilm and in human saliva." J Appl Microbiol **111**: 1515-1523.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q. (1998). "Photodynamic therapy." J Natl Cancer Inst **90**: 889-905.
- Dousseau, F., Therien, M., Pézolet, M. (1989). "On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins." Appl Spectrosc **43**: 538 – 542
- Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R., Gilbert, P. (1992a). "Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency." J Antimicrob Chemother **30**: 791-802.
- Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R., Gilbert, P. (1992b). "Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin." J Antimicrob Chemother **30**: 803-810.
- Dunne, W. M. Jr., Mason, E. O. Jr., Kaplan, S. L. (1993). "Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm." Antimicrob Agents Chemother **37**: 2522-2526.
- Eginton, P. J., Holah, J., Allison, D. G., Handley, P. S., Gilbert, P. (1998). "Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents." Lett Appl Microbiol **27**: 101-105.
- Eigen, M., Rigler, R. (1994). "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 5740-5747.
- Elson, E. L., Magde, D. (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy I. Conceptual basis and theory." Biopolymers **13**: 1-27.
- Erlich, G. D., Veeh, R., Wang, X. (2002). "Mucosal biofilm formation on the middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media." JAMA **287**: 1710-1715.
- Evans, R. C., Holmes, C. J. (1987). "Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer." Antimicrob Agents Chemother **31**: 889-894.

Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R., Gilbert, P. (1991). "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate." J Antimicrob Chemother **27**: 177-184.

Fatin-Rouge, N., Buffle, J. (2007). "Study of environmental systems by means of fluorescence correlation spectroscopy." Dans "Environmental colloids and particles: behaviour, separation and characterisation." John Wiley and Sons, United Kingdom.

Favero, M. S., Bond, W. W., Peterson, N. J., Cook, H. E. (1983). "Scanning electron microscopic observations of bacteria resistant to iodophor solutions." Dans "Proc Intern Symp Povidone." University of Kentucky, USA.

Fekrazad, R., Bargrizan, M., Sajadi, S., Sajadi, S. (2011). "Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin ((R)) against *Streptococcus mutans* (an in vitro study)." Photodiagnosis Photodyn Ther **8**: 249-253.

Feuerstein, O., Moreinos, D., Steinberg, D. (2006). "Synergic antibacterial effect between visible light and hydrogen peroxide on *Streptococcus mutans*." J Antimicrob Chemother **57**: 872-876.

Foster, J. S., Pan, P. C., Kolenbrander, P. E. (2004). "Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-coated flowcell." Biofilms **1**: 3-10.

George, A. M., Levy, S. B. (1983). "Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline." J Bacteriol **155**: 531-540.

Gilbert, P., Allison, D. G. (1999). "Biofilms and their resistance toward antimicrobial agents." Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.

Giwerzman, B., Jensen, E. T., Hoiby, N., Kharazmi, A., Costerton, J. W. (1991). "Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm." Antimicrob Agents Chemother **35**: 1008-1010.

Griffiths, P. A., Babb, J. R., Bradley, C. R., Fraise, A. P. (1997). "Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors." J Appl Microbiol **82**: 519-526.

Gristina, A. G., Hobgood, C. D., Webb, L. X., Myrvik, Q. N. (1987). "Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance." Biomaterials **8**: 423-426.

Guggenheim, B., Regolati, B., Muhlemann, H. R. (1972). "Caries and plaque inhibition by mutanase in rats." Caries Res **6**: 289-297.

- Gulot, E., Georges, P., Brun, A., Fontaine-Aupart, M. P., Bellon-Fontaine, M. N., Briandet, R. (2002). "Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation." Photochem Photobiol **75**: 570-578.
- Hissett, T., Verran, L., Marchall, G. P. (1995). "Abstract submitted to the 132th Ordinary meeting of the Society of General Microbiology." University of Aberdeen, United Kingdom.
- Holah, J. T., Bloomfield, S. F., Walker, A. J., Spenceley, H. (1994). "Control of biofilms in the food industry." Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.
- Hoyle, B. D., Wong, C. K., Costerton, J. W. (1992). "Disparate efficacy of tobramycin on Ca(2+)-, Mg(2+)-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Can J Microbiol **38**: 1214-1218.
- Huang, C. T., Yu, F. P., Stewart, P. S. (1995). "Non-Uniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection." Appl Environ Microbiol **61**: 2252-2256.
- Keltrup, J., Funder-Nielsen, T. D. (1972). "Molecular interactions between extracellular polysaccharides of *Streptococcus mutans*." Arch of Oral Biology **17**: 1659-1670.
- Kjelleberg, S., Molin, S. (2002). "Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?" Curr Opin Microbiol **5**: 254-258.
- Konkel, M. E., Garvis, S. G., Tipton, S. L., Anderson, D. E. Jr., Cieplak, W. Jr. (1997). "Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*." Mol Microbiol **24**: 953-963.
- Landa, A. S., van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (1999). "Recalcitrance of *Streptococcus mutans* biofilms towards detergent-stimulated detachment." Eur J Oral Sci **107**: 236-243.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., Caldwell, D. E. (1991). "Optical sectioning of microbial biofilms." J Bacteriol **173**: 6558-6567.
- Lawrence, J. R., Wolfaardt, G. M., Korber, D. R. (1994). "Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy." Appl Environ Microbiol **60**: 1166-1173.
- Le, T., Psaltis, A., Tan, L. W., Wormald, P. J. (2008). "The efficacy of topical antibiofilm agents in a sheep model of rhinosinusitis." Am J Rhino **22**: 560-567.
- Levy, S. B. (1992). "Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **36**: 695-703.

- Löe, H. (2000). "Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease." Int Dent J **50**: 129-139.
- Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbiol Rev **50**: 353-380.
- Luby-Phelps, K., Lanni, F., Taylor, D. L. (1988). "The submicroscopic properties of cytoplasm as a determinant of cellular function." Annu Rev Biophys Chem **17**: 369-396.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., Hearst, J. E. (1993). "Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**: 6299-6313.
- Maiti, S., Haupts, U., Webb, W. W. (1997). "Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 11753-11757.
- Marcotte, L. (2000). "Étude de la diffusion des détergents et de la quantification des sucres sur des biofilms bactériens par spectroscopie infrarouge." Mémoire de Maitrise en sciences, Université de Montréal, Canada.
- Marcotte, L., Therien-Aubin, H., Sandt, C., Barbeau, J., Lafleur, M. (2004). "Solute size effects on the diffusion in biofilms of *Streptococcus mutans*." Biofouling **20**: 189-201.
- Markham, P. N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M. E., Neyfakh, A. A. (1999). "Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **43**: 2404-2408.
- Marquis, R. E. (1968). "Salt-induced contraction of bacterial cell walls." J Bacteriol **95**: 775-781.
- McLeod, B. R., Fortun, S., Costerton, J. W., Stewart, P. S., (1999). "Enhanced bacterial biofilm control using electromagnetic fields in combination with antibiotics." Methods Enzymol **310**: 656-670.
- Metcalf, D., Robinson, C., Devine, D., Wood, S. (2006). "Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation." J Antimicrob Chemother **58**: 190-192.
- Mueller, R. F., Characklis, W. G., Jones, W. L., Sears, J. T. (1992). "Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis." Biotechnol Bioeng **39**: 1161-1170.

- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., Costerton, J. W. (1985). "Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material." Antimicrob Agents Chemother **27**: 619-624.
- Nisengard, R. L., Newman, M. G. (1994). "Oral Microbiology and immunology." W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Ohno, T., Ohki, A., Matsuoka, T. (1998a). "Room-temperature CW operation of II – VI lasers grown on ZnSe substrates cleaned with hydrogen plasma." J Crystal Growth **184/185**: 550-553.
- Ohno, T., Ohki, A., Matsuoka, T. (1998b). "Surface cleaning with hydrogen plasma for low-defect-density ZnSe homoepitaxial growth." J Vac Sci Technol **16**: 2539-2545.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). "Biofilm formation as microbial development." Annu Rev Microbiol **54**: 49-79.
- Peters, P., Schloz, M. (1990). "Fluorescence photobleaching techniques." Dans "New techniques of optical microscopy and microspectroscopy", Macmillan, United Kingdom.
- Prakash, B., Veeregowda, B., Krishnappa, M.G. (2003). "Biofilms: A survival strategy of bacteria." Curr Sci India **85**: 9-10.
- Prosser, B. L., Taylor, D., Dix, B. A., Cleeland, R. (1987). "Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm." Antimicrob Agents Chemother **31**: 1502-1506.
- Quirynen, M. (1994). "The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments." J Dent, **22**: 13-16.
- Raad, I., Hanna, H. (1999). "Intravascular catheters impregnated with antimicrobial agents: a milestone in the prevention of bloodstream infections." Support Care Cancer **7**: 386-390.
- Rediske, A. M., Roeder, B. L., Nelson, J. L., Robison, R. L., Schaalje, G. B., Robison, R. A., Pitt, W. G. (2000). "Pulsed ultrasound enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo." Antimicrob Agents Chemother **44**: 771-772.
- Renau, T. E., Leger, R., Flamme, E. M., Sangalang, J., She, M. W., Yen, R., Gannon, C. L., Griffith, D., Chamberland, S., Lomovskaya, O., Hecker, S. J., Lee, V. J., Ohta, T., Nakayama, K. (1999). "Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin." J Med Chem **42**: 4928-4931.
- Renye, J. A. Jr., Piggot, P. J., Daneo-Moore, L., Buttaro, B. A. (2004). "Persistence of *Streptococcus mutans* in Stationary-Phase Batch Cultures and Biofilms." App Env Microbiol **70**: 6181-87.

- Rigler, R., Elson, E. (2001). "Fluorescence correlation spectroscopy, theory and applications." Dans "Springer series in chemical physics." Springer Verlag, Germany.
- Roberts, S., Bass, Brading, M., Lappin-Scott, H., Stoodley, P. (1999). "Biofilm formation et structure: what's new?" Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.
- Sandt, C., Barbeau, J., Gagnon, M. A., Lafleur, M. (2007). "Role of the ammonium group in the diffusion of quaternary ammonium compounds in *Streptococcus mutans* biofilms." J Antimicrob Chemother **60**: 1281-1287.
- Siegrist, H., Gujer, W. (1985). "Mass transfer mechanisms in a heterotrophic biofilm." Water Res **19**: 1369-1378.
- Sihorkar, V., Vyas, S. P. (2001). "Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies." Pharm Res **18**: 1247-1254.
- Slack, M. P., Nichols, W. W. (1981). "The penetration of antibiotics through sodium alginate and through the exopolysaccharides of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*." Lancet **2**: 502-503.
- Slack, M. P., Nichols, W. W. (1982). "Antibiotic penetration through bacterial capsules and exopolysaccharides." J Antimicrob Chemother **10**: 368-372.
- Smith, A., Buchinsky, F. J., Post, J. C. (2011). "Eradicating chronic ear, nose, and throat infections: a systematically conducted literature review of advances in biofilm treatment." Otolaryngol Head Neck Surg **144**: 338-347.
- Sondossi, M., Rossmore, H. W., Wireman, J. W. (1985). "Observation of resistance and cross-resistance to formaldehyde condensate biocide in *Pseudomonas aeruginosa*." Int Biodeterior **21**: 105-106.
- Spach, D. H., Silverstein, F. E., Stamm, W. E. (1993). "Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy." Ann Intern Med **118**: 117-128.
- Spencer, R. C. (1999). "Novel methods for the prevention of infection of intravascular devices." J Hosp Infect **43**:127-135.
- Stejskal, E. O, Tanner, J. E. (1965). "Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient." J Chem Phys **42**: 288–292.
- Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., Lewis, K. (2000). "Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor." Proc Natl Acad Sci USA **97**: 1433-1437.

- Stewart, P. S., Grab, L., Diemer, J. A. (1998). "Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system." J Appl Microbiol **85**: 495-500.
- Stewart, P. S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J. G., Lewandowski, Z., Ochsner, U. A., Hassett, D. J. (2000). "Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Appl Environ Microbiol **66**: 836-838.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. (1998). "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." J Appl Microbiol **85**: 19S-28S.
- Stoodley, P., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. (1999a). "Biofilm structure and behavior: Influence of hydrodynamics and nutrients." Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.
- Stoodley, P., Boyle, J. D., Cunningham, A. B., Dodds, I., Lappin-Scott, H. M., Lewandosky, Z. (1999b). "Biofilm structure and influence on Biofouling under laminar and turbulent flows." Dans "Biofilms in aquatic systems." Cambridge Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Stoodley, P., de Beer, D., Boule, J. D., Lappin-Scott, H. M. (1999c). "Evolving perspectives of biofilm structure." Biofouling **14**: 1-16.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., Geesey, G. G. (1994). "Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **38**: 2125-2133.
- Suci, P. A., Vraný, J. D., Mittelman, M. W. (1998). "Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy." Biomaterials **19**: 327-339.
- Sutherland, I. W. (1999). "Biofilm matrix polymers – Role in adhesion." Dans "Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease." Cardiff University, United Kingdom.
- Takagi, N., Anazawa, T., Nishiyama, I., Suga, O. (2010). "Evaluation of the contamination removal capability and multilayer degradation in various cleaning methods." Proc. SPIE **7823**: 27-28.
- Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., Kato, T. (2004). "A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens." Oral Microbiol Immunol **19**: 61-64.
- Tatevossian, A. (1979). "Diffusion of radiotracers in human dental plaque." Caries Res **13**: 154-162.

- Taylor, G. T., Zheng, D., Lee, M., Troy, P. J., Gyananath, G., Sharma, S. K. (1997). "Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters." Biofouling **11**: 31-57.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., Tomasz, A. (1986a). "The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth." J Gen Microbiol **132**: 1297-1304.
- Tuomanen, E., Durack, D. T., Tomasz, A. (1986b). "Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria." Antimicrob Agents Chemother **30**: 521-527.
- van Loodsrecht, M. C. M., Norde, W., Lyklema, J., Zehner, A. J. B. (1990). "Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion." Aquat Sci **52**: 103-114.
- Vieira, M. J., Melo, L. F. (1999). "Intrinsic kinetics of biofilms formed under turbulent flow and low substrate concentrations." Bioprocess Eng **20**: 369-375.
- Vogt, M., Flemming, H. C., Veeman, W. S. (2000). "Diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A pulsed field gradient NMR study." J Biotechnol **77**: 137-146.
- Wang, E. W., Agostini, G., Olomu, O., Runco, D., Jung, J. Y., Chole, R. A. (2008). "Gentian violet and ferric ammonium citrate disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Laryngoscope **118**: 2050-2056.
- Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D., Svensäter, G. (2004). "Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation." Appl Environ Microbiol **70**: 3736-3741.
- Wentland, E. J., Stewart, P. S., Huang, C. T., McFeters, G. A. (1996). "Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm." Biotechnol Prog **12**: 316-321.
- Wieland, A., de Beer, D., Damgaard, L. R., Kuhl, M., van Dusschote, D., Van As, H. (2001). "Fine-scale measurement of diffusivity in a microbial mat with nuclear magnetic resonance imaging." Limnol Oceanogr **46**: 248-259.
- Woo, G. L., Mittelman, M. W., Santerre, J. P. (2000). "Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer." Biomaterials **21**: 1235-1246.
- Yayin, L., Jianlin, Y., Guanxin, L., LiHua, L. (2009). "Effect of EDTA on the mucoid *Pseudomonas aeruginosa*" Chin J Microecol **21**: 125-127.
- Zakka, E., Constantoudis, V., Gogolides, E. (2007). "Roughness formation during plasma etching of composite materials: a kinetic Monte Carlo approach." Plasma Sci **35**: 1359 – 1369

Zambrano, M. M., Colter, R. (1995). "Changes in bacterial cell properties on going from exponential growth to stationary phase." Dans "Microbial Quality Assurance: A Guide towards Relevance and reproducibility." Boca Raton, United States.

Zanin, I. C., Goncalves, R. B., Junior, A. B., Hope, C. K., Pratten, J. (2005). "Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study." J Antimicrob Chemother **56**: 324-330.

Zhang, Z., Nadezhina, E., Wilkinson, K. J. (2011). "Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*." Antimicrob Agents Chemother **55**: 1075-1081.