

2m11.2866.6

Université de Montréal

Étude de la diffusion de détergents et la quantification des sucres sur des
biofilms bactériens par spectroscopie infrarouge.

Par

Lucie Marcotte

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Décembre 2000

© Lucie Marcotte, 2000



QD

3

U54

2001

10.021

100
448

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude de la diffusion de détergents et la quantification des sucres sur des
biofilms bactériens par spectroscopie infrarouge.

présenté par:

Lucie Marcotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente-rapporteuse	Badia, Antonella
Directeur de recherche	Lafleur, Michel
Codirecteur	Barbeau, Jean
Membre du jury	Ellis, Thomas Hill

Mémoire accepté le: _____

Sommaire

Le biofilm est une forme de croissance bactérienne qui se développe à l'interface solide-liquide et qui est schématisé comme un consortium de bactéries retenues entre elles par une matrice d'exopolysaccharides. Le but de cette étude est de mieux comprendre leur composition chimique et d'examiner la diffusion de détergents à travers un biofilm *in vitro*.

Nous proposons une nouvelle méthode de quantification des sucres totaux dans les échantillons bactériens basée sur la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Des bandes caractéristiques de vibrations de l'ADN (1240 cm^{-1}) et des protéines (bande Amide II à 1550 cm^{-1}) nous servent à estimer la quantité de bactéries, tandis qu'une région où contribuent principalement les sucres (de 970 à 1180 cm^{-1}) est utilisée pour doser les sucres. Une analyse spectrale systématique est présentée pour extraire les surfaces des bandes pertinentes. La méthode est d'abord appliquée sur une série de mélanges modèles. La relation linéaire entre le rapport en poids sucres/protéines et le rapport des bandes caractéristiques sucres/protéines montrent une déviation standard de 10% tandis que celle entre le rapport en poids de sucres/ADN et les rapports de bandes sucres/ADN montre une déviation standard de 22%. La méthode infrarouge présentée est moins dépendante du type de sucres que la méthode colorimétrique de Dubois et al.¹ qui est la plus utilisée en microbiologie. De plus, la méthode infrarouge est simple et ne demande qu'une seule mesure.

La spectroscopie IR par réflexion totale atténuée est utilisée pour étudier la croissance d'un biofilm de *Streptococcus mutans* obtenu *in vitro* ainsi que la diffusion de trois tensioactifs dans ce dernier. Les conditions de croissance nous ont permis d'obtenir de manière reproductible un biofilm en 20 heures comprenant $2.5 (\pm 1.1) \times 10^8$ UFC/cm². Les détergents ont été utilisés sous

forme de micelles et choisis en fonction de leurs charges: le docécylsulfate de sodium (SDS) chargé positivement, le chlorure de cétylpérydium (CPC) chargé négativement et le Triton X-100 qui est neutre. Le SDS montre deux modes de diffusion. Les constantes de diffusion peuvent être estimées à $D_1 = 2.8 (\pm 2.2) \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $D_2 = 3.1 (\pm 2.5) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Le SDS cause une diminution de la cohésion de la biomasse et de sa viabilité ainsi que de la reproduction des cellules bactériennes. Le CPC démontre une interaction avec le biofilm et présente une diffusion lente. Les charges du CPC influencent sa diffusion dans le biofilm de *Streptococcus mutans*. Du point de vue des bactéries, le CPC montre les mêmes influences sur la viabilité du biofilm que le SDS. Le Triton X-100 diffuse apparemment selon un seul mode dont la constante de diffusion est estimée à $2.2 (\pm 1.7) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Il n'influence ni la cohésion, ni la viabilité du biofilm. Nous proposons diverses hypothèses pour expliquer ces résultats. Cependant, nous n'observons pas de corrélation entre la capacité de diffusion d'un espèce moléculaire et son pouvoir bactéricide.

Table des matières

SOMMAIRE	I
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	X
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
I.1 Bactéries.....	1
I.2 Biofilm	6
I.3 Spectroscopie infrarouge	9
<i>I.3.1 Spectroscopie infrarouge de bactéries</i>	9
<i>I.3.2 Approche analytique par transmission</i>	12
<i>I.3.3 Réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflection ATR)</i>	13
CHAPITRE II : MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES SUCRES PAR SPECTROSCOPIE IR.	15
II.1 Introduction	15
<i>II.1.1 Méthodes existantes</i>	15
<i>II.1.2 Spectroscopie IR analytique appliquée aux mélanges complexes</i>	17
II.2 Matériels et méthodes.....	20
<i>II.2.1 Provenance des produits et préparation des milieux de culture</i>	20
<i>II.2.2 Méthode infrarouge</i>	21
II.2.2.1 Préparation des échantillons	21
<i>Mélanges modèles</i>	21
<i>Échantillons bactériens</i>	22
II.2.2.2 Acquisition spectrale des échantillons.....	23
<i>II.2.3 Méthode de Dubois et al.¹ – dosage des sucres</i>	24
<i>Préparation des échantillons</i>	24
<i>Protocole</i>	24
<i>II.2.4 Test de Bardford³⁵ – dosage des protéines</i>	25
<i>Préparation des échantillons</i>	25
<i>Protocole</i>	25

II.3 Résultats et discussion.....	26
II.3.1 Détermination du coefficient d'absorptivité massique ϵ des sucres.....	26
II.3.2 Traitement des bandes IR.....	29
II.3.3 Comparaison de la méthode IR versus la méthode de Dubois et al. et de Bradford.....	36
II.3.4 Application de la méthode à des échantillons bactériens.....	37
II.4 Conclusion.....	43
CHAPITRE III : DIFFUSION DE DÉTERGENTS DANS UN BIOFILM DE STREPTOCOCCUS MUTANS PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DE RÉFLEXION TOTALE ATTÉNUÉE.....	44
III.1 Introduction.....	44
III.1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	45
III.1.2 Méthode infrarouge par réflexion totale atténuée.....	46
III.1.3 Facteurs qui influencent la diffusion.....	47
III.1.4 Détergents et leur rôle dans le contrôle des bactéries.....	49
III.2 Matériels et méthodes.....	51
III.2.1 Provenance des produits.....	51
III.2.2 Minibioréacteur.....	52
III.2.3 Courbe de croissance du <i>Streptococcus mutans</i>	54
III.2.4 Montage IR et protocole expérimentale.....	55
III.3 Résultats et discussion.....	58
III.4 Conclusion.....	82
CHAPITRE IV : CONCLUSION.....	85
RÉFÉRENCES.....	87
ANNEXE I.....	93

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Coefficient d'absorptivité massique des sucres.....	27
Tableau II.2 : Détermination du rapport sucres/protéines d'échantillons modèles par la méthode colorimétrique de Dubois et al. et de Bradford et par la méthode IR.....	36
Tableau II.3 : Rapports de sucres en fonction des protéines ou de l'ADN pour différents échantillons bactériens.....	38
Tableau III.1 : Bilan des tests de cohésion, de viabilité et de compte viable sur le biofilm après diffusion des détergents.....	76
Tableau A-1 : Composition des mélanges ternaires.	93

Liste des figures

Figure I.1 :	Schématisation d'une coupe transversale d'une bactérie et identification de ses principales composantes.	2
Figure I.2 :	Schématisation d'un biofilm.	7
Figure I.3 :	Spectre infrarouge de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> qui provient d'une gélose lait 4%.	11
Figure I.4 :	Schématisation des modes de vibration Amide I et Amide II. ²	11
Figure I.5 :	Parcours optique dans le module ATR.	14
Figure I.6 :	Profondeur de l'onde évanescente en fonction du nombre d'onde.	14
Figure II.1 :	Spectres IR de substances pures : A) Alginate qui est un polysaccharide, B) ADN et C) albumine qui est une protéine.	19
Figure II.2 :	Vérification de la linéarité de la surface de bande A_{sucres} en fonction du poids de sucre déposé sur la cellule de CaF_2 avec les valeurs des pentes des régressions linéaires. A) D-lactose B) sucrose et C) alginate.	28
Figure II.3 :	Simulation de la bande Amide II du spectre IR d'un mélange ternaire et d'un spectre IR de <i>Streptococcus mutans</i>	31
Figure II.4 :	Simulation de la bande ADN sur un spectre de <i>Streptococcus mutans</i>	32

Figure II. 5 :	Rapports de l'aire des bandes caractéristiques obtenues par la méthode IR pour les mélanges modèles en fonction de leurs rapports en poids.	35
Figure II.6 :	Spectres IR. A) Mélange modèle composé d'alginate, d'albumine et d'ADN. B) Plaque dentaire supragingivale prélevée de manière <i>in vivo</i> sur les incisives d'un volontaire. C) Plaque dentaire cultivée sur gélose sang à 37°C.....	39
Figure II.7 :	Comparaison de deux genres bactériens en utilisant l'aire de la bande ADN ou protéine obtenue à partir de la méthode IR en fonction du nombre de bactéries déposées sur la fenêtre de CaF ₂ . A) Genre <i>Pseudomonas</i> , B) genre <i>Streptococcus</i>	42
Figure III.1 :	Schématisation d'un tensioactif.....	49
Figure III.2 :	Vue en coupe transversale d'une micelle formée par les molécules amphiphiles en solution aqueuse. ³	49
Figure III.3 :	A) Dodécylsulfate de sodium (SDS), B) chlorure de cétylepéridium (CPC) et C) Triton X-100.	50
Figure III.4 :	Montage pour le minibioréacteur.....	53
Figure III.5 :	Schéma du montage ATR.....	55
Figure III.6 :	Courbes de croissance du <i>Streptococcus mutans</i> dans le TYE avec 0.5% (p/v) glucose et avec 0.5% (p/v) sucrose.	60
Figure III.7 :	Évolution des spectres IR du biofilm qui croît sur le cristal ATR.	62

- Figure III.8 :** Évolution de la surface des bandes caractéristiques de l'ADN, de sucres et des protéines en fonction du temps de croissance.63
- Figure III.9 :** A) Schématisation du biofilm hydraté en forme de colonne vu latéralement B) Photo du biofilm sec sur le cristal ATR vu du dessus.68
- Figure III.10 :** Comparaison de spectres de *Streptococcus mutans* A) sous forme de biofilm et B) d'une croissance sur gélose sang.69
- Figure III.11 :** Spectres de différence du spectre du biofilm pendant la diffusion moins celui avant la diffusion pour chacun des détergents.71
- Figure III.12 :** Exemple de profil de diffusion pour chacun des tensioactifs étudiés dans ce travail. A) SDS sur une période de 20 minutes, B) Triton X-100 sur une période de 20 minutes et C) CPC sur une période de 40 minutes.73
- Figure III.13 :** Spectre de différence du spectre du biofilm après le lavage moins le spectre du même biofilm avant la diffusion. A) SDS, B) Triton X-100 et C) CPC.77

Liste des abréviations

ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> – Réflexion totale atténuée
CPC	Chlorure de cétylpéridium
DO	Densité optique
d_p	Profondeur de l'onde évanescente
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
IR	Infrarouge
SDS	Docécylsulfate de sodium
UFC	Unités formant des colonies

Remerciements

Je tiens à remercier, tout d'abord, mon directeur de maîtrise, M. Michel Lafleur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche. Je veux aussi lui témoigner ma reconnaissance pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique constante qui m'ont servi d'exemple au cours de ce travail.

Je veux aussi remercier mon codirecteur, M. Jean Barbeau, pour m'avoir enseigné les mystères de la microbiologie par sa grande compétence, mais surtout, pour son écoute et ses conseils qui me furent précieux tout au long de ma recherche.

Je tiens aussi à remercier spécialement Mme Annie Leduc et Mme Jacinthe Séguin qui m'ont appris tout ce que je sais sur les techniques de laboratoire en microbiologie.

Je remercie grandement les membres des groupes de Michel Lafleur et de Jean Barbeau pour les rires, les encouragements et nos merveilleuses discussions le midi! Merci à Benoît Crompt pour les tuyaux en mathématique, en chimie quantique et en informatique.

Finalement, je n'aurais jamais persévéré sans l'appuie de mes parents adorés. Merci à mes amis pour vos encouragements. Merci à mon copain, Stéphane, qui a vécu les hauts et les bas à mes cotés et qui a toujours su m'apporter le soutien nécessaire.

*À mes parents,
Je vous aime de tout mon cœur.*

Chapitre I

Introduction

Le biofilm est une organisation très complexe dont les composantes et leur organisation restent encore à définir en détails. On sait que les biofilms présentent une très grande résistance aux bactéricides, mais les raisons de cette résistance sont encore méconnues. Il est possible que ce phénomène soit associé à la diffusion limitée des molécules dans le biofilm. L'objectif de ce travail est donc d'apporter une certaine lumière sur ce point en mesurant la diffusion d'antibiotiques dans des biofilms à l'aide de la spectroscopie infrarouge (IR) par réflexion totale atténuée (ATR). Un nouvel outil pour quantifier la production de sucres dans des échantillons bactériens par spectroscopie IR de transmission est aussi présenté.

I.1 Bactéries

Les bactéries existent depuis des milliards d'années. Ces êtres vivants unicellulaires ont su s'adapter à tous les types de climats, d'atmosphères et d'environnements. C'est d'ailleurs grâce à cette formidable capacité d'adaptation qu'on retrouve des bactéries à peu près partout. Les bactéries peuvent se présenter sous plusieurs formes. On retrouve trois formes générales qui varient en grosseur. Il y a des bactéries de forme oblongue, que l'on appelle bacilles, les bactéries sphériques que l'on nomme coques, et finalement, les bactéries en forme de spirale que l'on nomme spirilles.^{4,5} Au delà de leur forme, elles varient aussi au niveau de leur taille et de leur arrangement (chaînette, quatre à quatre, etc.). Malgré ces variations, leurs structures demeurent semblables. Le schéma d'une coupe transversale d'une bactérie est représenté à la **Figure I.1**. Une bactérie est composée d'une membrane cellulaire comme les cellules eucaryotes, tandis que son ADN n'est

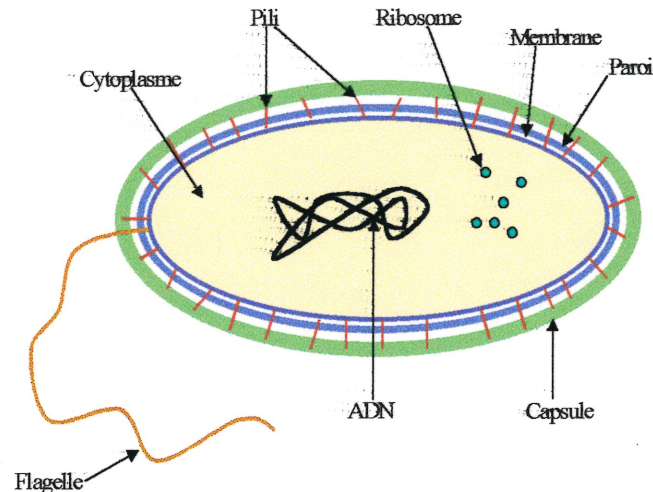


Figure I.1 : Schématisation d'une coupe transversale d'une bactérie et identification de ses principales composantes.

pas contenu dans une membrane et baigne dans le cytoplasme ce qui en fait une cellule procaryote. Leur dimension peut varier de 1-2 μm par 1-4 μm .⁴ Les composantes physiques de la cellule permettent de distinguer un protozoaire ou un virus d'une bactérie. Effectivement, les virus sont composés d'un matériel génétique enveloppé d'une capsule protéique. Le protozoaire est un organisme unicellulaire qui possède un noyau cellulaire qui contient le matériel génétique et est donc d'un niveau plus complexe que les bactéries.⁴ Il est impossible de dresser ici le portrait complet du monde bactérien, mais nous allons tout de même faire le survol des composantes pertinentes à ce travail.

Premièrement, comme il est représenté à la **figure I.1**, les bactéries possèdent une membrane cellulaire et une paroi cellulaire. La paroi cellulaire, qui enveloppe la membrane, joue un rôle de protection osmotique, est responsable de la forme de la bactérie et sert de lieu d'attache pour les flagelles. Les bactéries sont généralement porteuses de charges au niveau de leurs parois. Par exemple, la majorité des streptocoques possèdent un potentiel zéta négatif.⁶ La paroi cellulaire peut être absente chez certaines bactéries.^{4,7} La paroi cellulaire est le site d'action des lysosymes, des

détergents et autres bactéricides.⁷ Elle est faite d'acides diaminopiméliques, d'acides muramiques et d'acides teïchoïques. Elles sont des substances uniques aux bactéries,⁴ ainsi que le peptidoglycan qui est un polymère de sucres aminés et d'acides aminés.^{5,7} Les parois contiennent aussi des acides aminés, des sucres aminés et des lipides. Elles peuvent avoir de 10 à 25 nm d'épaisseur. Elles constituent de 10 à 40 % du poids sec d'une bactérie. À partir des parois bactériennes, il est possible de faire deux grandes classifications de bactéries. Tout d'abord, les gram-positives, dont la paroi contient un faible pourcentage de lipides (1-4%)⁴, ont une susceptibilité accrue à la pénicilline, mais ont une bonne résistance mécanique. Ensuite, les gram-négatives, dont la paroi a une teneur en lipides plus importante (11-22%), sont moins susceptibles à la pénicilline et ont une résistance mécanique moindre.⁴ La classification de Gram d'une espèce se fait à l'aide d'un test de coloration des cellules bien connu en microbiologie.^{4,5} La membrane cytoplasmique (**Figure I.1**) est une bicouche de phospholipides fluide dans laquelle se retrouvent des lipoprotéines et des glycoprotéines. La membrane cytoplasmique est perméable de manière sélective et est le lieu d'action de l'alcool et des ammoniums quaternaires.⁷

Deuxièmement, les bactéries sont souvent entourées d'une capsule de polysaccharides qui contribue à leur adhésion sur des surfaces (**Figure I.1**). Les fibres des polysaccharides ainsi que les glycoprotéines qui se retrouvent dans la capsule interagissent avec la surface des solides via des interactions hydrophobes⁸ et des liaisons faibles (pont hydrogène ou liaison de Van der Waal). Dans le cas d'adhésion sur des cellules épithéliales, les glycoprotéines et autres protéines qui se retrouvent dans la capsule peuvent interagir avec des récepteurs membranaires.⁸ La capsule possède aussi d'autres rôles comme celui de protecteur contre les agents extérieurs, de réservoir où s'emmagasine la nourriture et même de site de rejet de déchets métaboliques.^{4,5}

La plupart des gram-négatives ont des pili (**Figure I.1**) qui sont de très nombreux petits poils à la surface de la cellule responsables de l'adhésion.^{4,5} Il a été démontré que certaines bactéries possèdent une mobilité grâce à leurs pili.⁹ Plusieurs bactéries possèdent aussi des flagelles qui leur permettent de se déplacer dans un liquide. Celles-ci sont très longues (plusieurs fois le diamètre de la cellule) et très fines (10-20 nm).^{4,5} Par contre, les flagelles se retrouvent en petit nombre sur les bactéries par rapport aux pili. Les pili et les flagelles sont faits de protéines globulaires bien organisées.⁵

Finalement, le matériel génétique des bactéries est circulaire souvent regroupé sous forme de pelote statistique (**Figure I.1**). Il n'est pas enfermé dans une membrane contrairement à celui des cellules eucaryotes. Le matériel génétique contient les génotypes qui donnent forme au phénotype. De manière générale, le génotype d'une culture bactérienne ne varie pas, à moins qu'il y ait une mutation. Par contre, le phénotype d'une culture peut varier selon les conditions auxquels la culture bactérienne est confrontée. Certains gènes peuvent être actifs dans des conditions alors que normalement le gène n'est pas exprimé.⁴

Une autre caractéristique majeure des bactéries est leur très haut taux de croissance. Les bactéries se reproduisent par fission et se voient donc multipliées de manière exponentielle. Le matériel génétique se duplique dans la cellule mère et la membrane se sépare pour former deux cellules filles.^{4,10} Donc, si une bactérie viable est isolée sur un milieu de culture solide, une gélose par exemple, au bout de quelques heures, un point est observable. C'est une colonie. Les colonies possèdent des couleurs et des morphologies différentes selon l'espèce bactérienne et le milieu de culture choisi. Le temps que les cellules mettent à se diviser est appelé le temps de génération.⁴ Ce temps est plus ou moins long selon la souche étudiée et le milieu de culture utilisé. Une méthode pour trouver le temps de génération d'une souche est de tracer une courbe de croissance. À partir d'une culture liquide, on suit la

croissance bactérienne en fonction du temps. La croissance bactérienne peut être suivie par la densité optique du milieu (DO), ou encore, par le dénombrement d'unités formant des colonies (UFC) par mL. On porte la croissance bactérienne sur une échelle logarithmique en fonction du temps. Il y a alors trois portions de la courbe qui se distinguent. Tout d'abord, il est possible que la courbe montre un plateau en début de croissance: c'est une phase où les organisme se métabolisent en vue de leur reproduction dans les nouvelles conditions de croissance.⁴ Ensuite, on trouve une droite de pente positive qui montre la phase de croissance. Dans cette phase de leur croissance, les bactéries sont au maximum de leur capacité de croissance et c'est durant cette phase qu'elles sont les plus semblables physiologiquement. À la suite de cette croissance, il y a un ralentissement de la croissance qui vient d'une intoxication des cellules à cause d'une trop grande concentration de toxines qui ont été rejetées dans le milieu par les bactéries et/ou d'un manque de nutriments; ceci se traduit par l'apparition d'un plateau.⁴ Durant ce plateau, les bactéries commencent à présenter des différences physiologiques. Si la culture se poursuit au delà du plateau, on observe une diminution de la croissance bactérienne qui se voit sur la courbe par une droite à pente négative.⁴ Les cellules bactériennes meurent et se rompent.

Les bactéries sont des organismes très performants et ubiquistes. Il est vrai que certaines souches sont très nuisibles à la population, par contre, la majorité est inoffensive. Nous vivons en symbiose avec certaines d'entre elles situées dans nos intestins et sur les autres muqueuses de notre corps. On retrouve de plus en plus de souches présentant une multirésistance aux antibiotiques. C'est probablement le résultat d'un trop grand usage de bactéricides qui a amené une biosélectivité des bactéries super résistantes.

1.2 Biofilm

Avec l'invention du microscope par Antony van Leeuwenhoek en 1683, les premières cultures bactériennes ont été observées et une de celles-ci était de la plaque dentaire. En 1898, Black la qualifiait de « gelatinous microbial plaques » un terme qui englobait à la fois la culture de bactérie et les débris de nourritures qui se retrouvent dans la plaque.¹⁰ Par contre, jusqu'à tout récemment, les chercheurs ont principalement étudié les bactéries en laboratoire, en culture liquide ou sur des géloses. Les bactéries ont été décortiquées sous leur forme isolée. Ce n'est que tout récemment que l'étude des bactéries dans leur milieu naturel a connu un essor. Il semblerait que certains gènes, en présence des stress de l'environnement, soient exprimés pour donner un phénotype qui soit différent de ce qui avait été observé en laboratoire. En effet, les bactéries dans la nature peuvent former un consortium qui donnera naissance à ce que Costerton et son équipe ont appelé le *biofilm*.¹¹

On retrouve les biofilms partout où il y a interface solide-liquide, à des endroits très diversifiés tels que les coques de bateau, les systèmes d'aqueduc, les implants¹²⁻¹⁴, les unités dentaires,^{15,16} et les dents.^{8,17,18} Les bactéries s'accrochent à un solide, s'y multiplient et forment une structure d'exopolysaccharides appelée *slime* qui les protège des agressions de leur environnement.

Pour un biofilm hydraté, le volume est principalement occupé par de l'eau. Par contre, le biofilm sèche se compose de polysaccharides, de protéines, de sels et de matériels cellulaires.¹⁰ Les exopolysaccharides peuvent représenter de 50 à 95% du poids sec d'un biofilm.¹⁰ Les polymères qui composent la matrice jouent un rôle primordiale dans la détermination de ses propriétés.⁸ Certains exopolysaccharides peuvent être neutres, mais souvent ils sont chargés négativement et des cations bivalents (ex : Ca^{2+}) servent à faire des liens entre

les chaînes de sucre et créent une cohésion entre elles.⁸ Ces liens augmentent la gélification de la matrice et procure une rigidité au biofilm. La présence de fonctions polaires dans les chaînes - tels qu'alcool, acide carboxylique, amide, amine ou ester - contribuent aussi à la gélification à partir des cations bivalents.¹⁹ Dans le cas des chaînes neutres, on a observé un arrangement hélicoïdal, et même dans certain cas, il y a formation de triple hélices.⁸ Cette forme très ordonnée expulse les molécules d'eau de l'hélice et donne un caractère insoluble au polysaccharide.⁸ Les biofilms sont donc hétérogènes et complexes. Un schéma est représenté à la **Figure I.2**. La matrice d'exopolysaccharides entoure les microcolonies et offre une cohésion à la structure du biofilm. Par contre, des endroits moins denses en polysaccharides forment un réseau de canaux appelés les canaux d'eau ou « water channels »¹¹ Ces canaux d'eau serviraient à l'apport en nutriments et à l'expulsion des déchets métaboliques.^{20,11} Les microcolonies dans le biofilm présentent une hétérogénéité fonctionnelle; on parle alors de « communauté » bactérienne, car les bactéries adoptent un comportement complexe qui peut s'apparenter à celui de tissus d'organismes supérieurs.²⁰

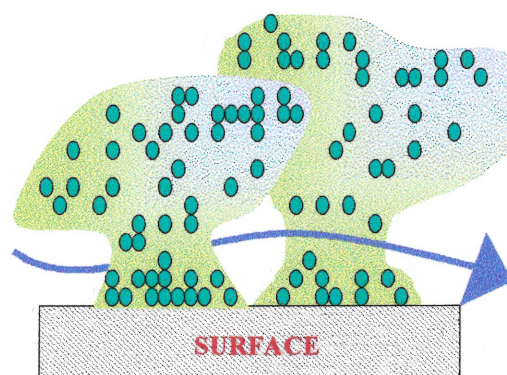


Figure I.2: Schématisation d'un biofilm. Les bactéries représentées par des sphères vertes sont retenues entre elles par la matrice d'exopolysaccharides. La flèche bleu montre la circulation de liquide qui peut se faire via des canaux d'eau.

Un autre point majeur des biofilms est leur résistance aux bactéricides qui est plusieurs fois plus grande à celle de la bactérie prise en dehors du biofilm.²⁰ La plupart des infections dues à la présence de biofilm sont souvent récurrentes à cause de cette résistance.²⁰ Le mécanisme de résistance aux antibiotiques des biofilms n'est pas bien compris. Entre autres, trois mécanismes de résistance sont proposés.^{20,21} La première hypothèse est reliée à la physiologie des bactéries dans le biofilm. En effet, les cellules bactériennes dans le biofilm ont un temps de génération plus lent que sous forme planctonique. Les bactéries qui se reproduisent lentement, ou pas du tout, sont alors moins sensibles à certains antibiotiques. Ce serait là une stratégie de survie grâce à une hétérogénéité dans l'état physiologique des bactéries. La deuxième hypothèse est que les antibiotiques réagissent avec d'autres composantes dans le biofilm et sont détruits avant même d'avoir atteint les cellules. La troisième hypothèse est que les bactéricides sont incapables de diffuser jusqu'aux bactéries situées plus profondément dans le biofilm. La matrice d'exopolysaccharides formerait un écran protecteur à travers duquel le passage de molécules serait plus difficile. Nous avons tenté de mieux comprendre la diffusion de surfactants antibiotiques dans un biofilm *in vitro* et de manière *in situ* à l'aide de la spectroscopie IR par réflexion totale atténuée.

Il semble que les biofilms possèdent une très grande quantité de sucres.²² On ne sait pas s'il se trouve plus de sucres dans la forme biofilm d'une souche par rapport à sa forme planctonique. Nous avons réalisé une étude de compositions chimiques d'échantillons bactériens et avons mis au point une technique de quantification des sucres à l'aide de la spectroscopie IR qui sera discutée au chapitre II.

I.3 Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) est déjà utilisée en taxinomie pour les bactéries.²³⁻²⁵ Dans le cadre de notre étude sur les bactéries et les biofilms, une approche analytique par transmission est utilisée pour déterminer la production de sucres d'une bactérie ainsi qu'une approche utilisant un montage à réflexion total atténuée (ATR) pour l'étude de la diffusion de surfactants dans un biofilm.

I.3.1 Spectroscopie infrarouge de bactéries

La spectroscopie IR a pour effet de promouvoir une molécule dans un état vibrationnel excité. On retrouve 3n-6 modes de vibration pour une molécule polyatomique comprenant n atomes. Par contre, pour que la vibration soit observable en IR, elle doit induire une variation du moment dipolaire. La **figure I.3** montre un spectre IR de bactérie. Les bandes ne sont pas toutes résolues étant donnée la complexité du système étudié. Par contre, il est possible d'identifier des régions représentatives des composantes de l'échantillon.^{17,26-28}

On trouve les bandes des modes d'élongation des liaisons O-H, ν_{OH} , des fonctions alcool ou acide et des élongations NH, ν_{NH} , des amines et amides situées de 3500 à 3000 cm^{-1} .²⁹ Comme les bandes se superposent beaucoup dans cette région, il est difficile de faire une attribution claire de chacune d'elles. De 3000 à 2800 cm^{-1} , on retrouve la région des élongations des liens C-H des carbones saturés ν_{C-H} . Cette région est attribuée aux acides gras qui se retrouvent dans la membrane plasmique des bactéries, aux sucres et aux autres composantes de la bactérie qui possèdent une liaison C-H. La région reliée à la vibration du groupement carbonyle des amides se trouve de 1695 à

1500 cm^{-1} . Dans cette région, deux modes du groupement amide sont visibles. La vibration la plus intense est la vibration Amide I et se trouve à environ 1600 cm^{-1} . La bande de vibration Amide II est moins intense et apparaît autour de 1555 cm^{-1} . Ces deux modes de vibrations sont représentés à la **figure I.4**. Chacun d'eux est associé aux protéines dans un échantillon bactérien étant donné la présence de la fonction amide dans les liens peptiques. D'ailleurs, c'est une région très utilisée en IR pour l'étude des structures secondaires des protéines.^{30,31} La région des vibrations d'élongation P-O-C du groupement phosphate, ν_{POC} , se trouve de 1260 à 1200 cm^{-1} .² Dans les échantillons bactériens, cette bande est attribuée à l'ADN à cause de l'abondance de ce groupement dans les brins d'ADN,^{27,28} mais il se peut aussi que les phospholipides montrent un signal dans cette région. Toutefois, les phospholipides se retrouvent majoritairement dans la membrane des bactéries et ne nuisent donc pas dans la détection de la quantité de bactérie. La région des vibrations d'élongation C-O, ν_{CO} , des fonctions éther et des fonctions alcool, entre 1180 et 970 cm^{-1} , est principalement associée aux sucres.²

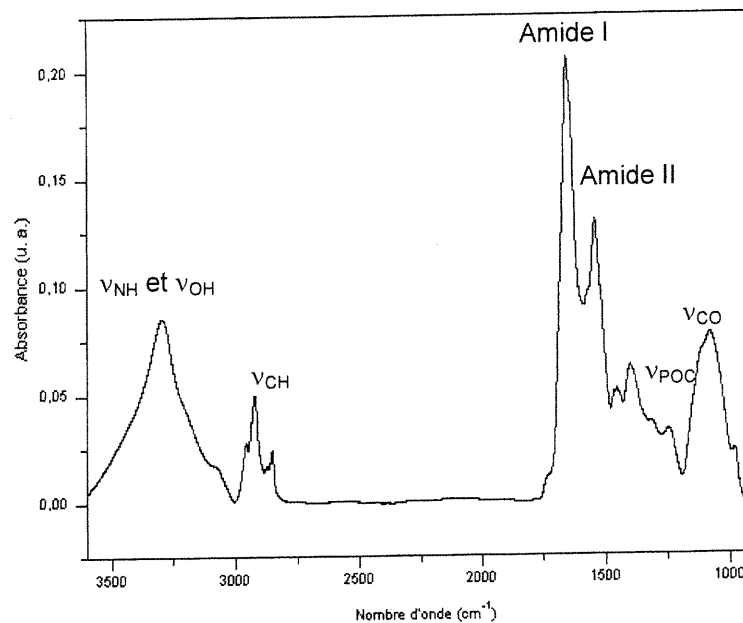


Figure I.3 : Spectre infrarouge de *Pseudomonas aeruginosa* qui provient d'une gélose lait 4%.

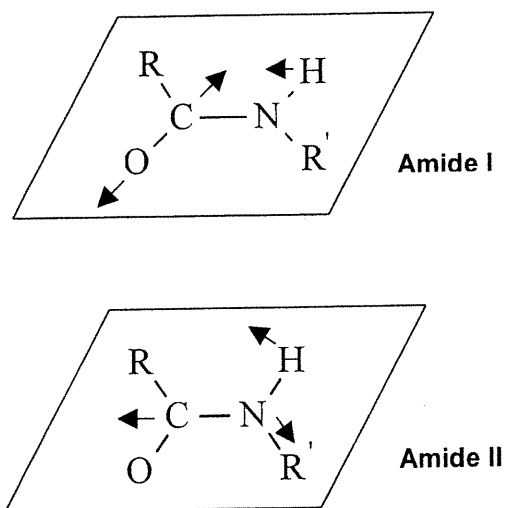


Figure I.4 : Schématisation des modes de vibration Amide I et Amide II.²

I.3.2 Approche analytique par transmission

La méthode la plus couramment utilisée pour faire l'acquisition d'un spectre en spectroscopie IR est celle où l'échantillon est placé dans le parcours optique du faisceau IR qui le traverse. On dit alors que l'on échantillonne par transmission.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons mis au point une méthode qui nous permet de quantifier la présence de sucres dans un échantillon bactérien. Nous nous sommes appuyés sur la loi de Beer (éq. 1.1). Selon cette loi, la concentration C de l'espèce étudiée est directement proportionnelle à l'absorbance, A , à une longueur d'onde donnée. L'absorbance dépend aussi du parcours optique dans l'échantillon, l , ainsi que du coefficient d'extinction, ϵ , à la longueur d'onde étudiée.

$$A = \epsilon Cl \quad (\text{éq. 1.1})$$

Dans la méthode IR de quantification des sucres, nous utilisons des surfaces de bandes pour lesquelles nous faisons des rapports qui sont ensuite comparés pour différents échantillons. L'étude se fait donc sur une fenêtre spectrale plutôt qu'à une longueur d'onde donnée. Aussi, l'échantillon n'est pas liquide, mais séché sous forme de film mince. En s'inspirant de la loi de Beer, nous assumons que la surface de la bande est proportionnelle à la quantité de matières traversées par le faisceau IR. Nous assumons aussi que le film est homogène.

I.3.3 Réflexion Total Atténuée (*Attenuated Total Reflection ATR*)

La méthode par réflexion totale atténuée (ATR) est une manière différente d'échantillonner. Le faisceau IR voyage à l'intérieur d'un cristal dans lequel il se produit des réflexions totales à cause de la différence d'indice de réfraction n entre le cristal et le milieu (**Figure 1.5**). À l'interface solide/gaz ou liquide, il se produit une réflexion totale où une onde parallèle à la normale avec la surface de réflexion s'établit dans le médium le moins dense (l'échantillon). L'intensité du champ électrique de cette onde évanescente diminue de manière exponentielle en s'éloignant de la surface.³² Sa profondeur de pénétration (d_p) dépend de l'angle incident de la réflexion (θ), de la longueur d'onde (λ) du faisceau et des indices de réfraction des milieux ($n_{21}=n_2/n_1$). d_p est décrit selon l'équation suivante :

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}} \quad (\text{éq. 1.2})$$

Cette onde évanescente est en mesure d'interagir avec les molécules qui se trouvent sur son chemin et donc il est possible d'obtenir un spectre de ce qui se trouve à la surface du cristal. Dans le cadre de ce travail, on utilise un cristal de séléniure de zinc ($n=2.403$) dans lequel les réflexions se font à 45° pour donner un profil de pénétration illustré à la **figure 1.6**. On obtient une profondeur de 2 à 4 μm pour les nombres d'ondes de 1750 à 750 cm^{-1} .

Comme la profondeur n'est pas la même pour chaque longueur d'onde, il faut faire une correction des spectres pour palier à ces différences. Pour ce faire, on divise l'absorbance obtenue par d_p qui corrige le spectre en ramenant toutes les longueurs d'onde au même parcours optique.

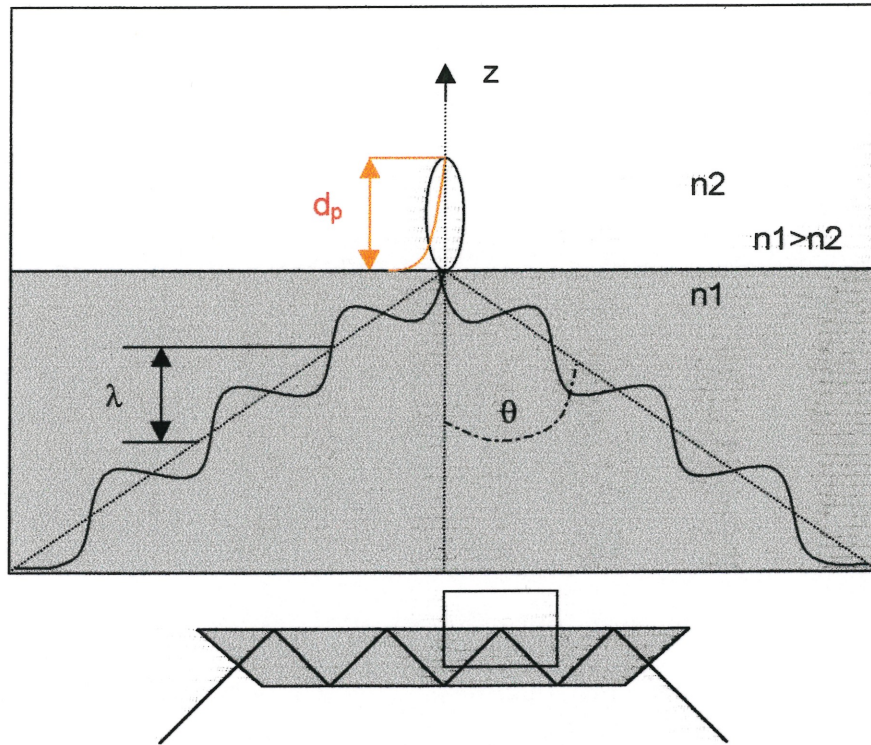


Figure I.5 : Parcours optique dans le module ATR. La longueur d'onde est représentée par λ , et les indices de réfraction des milieux, par n . d_p représente la profondeur de pénétration.

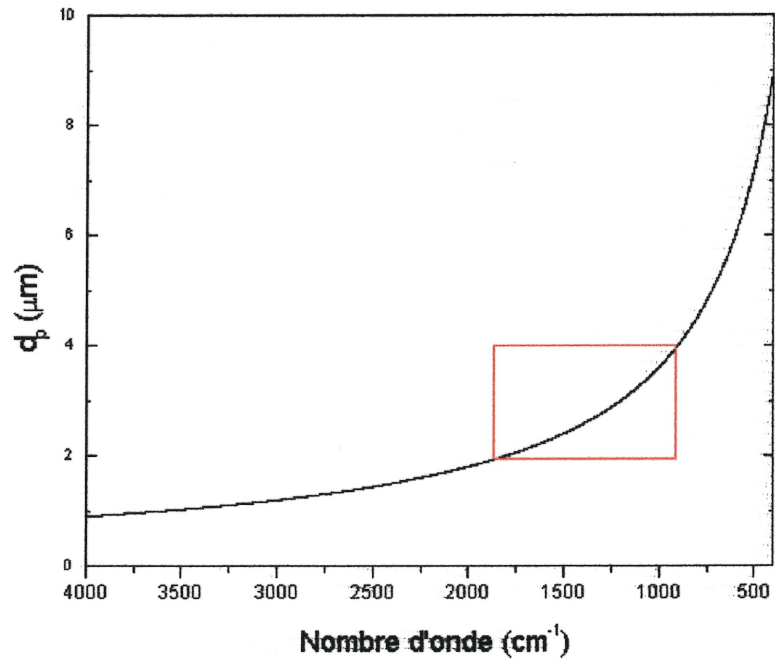


Figure I.6 : Profondeur de l'onde évanescente en fonction du nombre d'onde. Le rectangle rouge indique la principale région qui est utilisée dans ce travail et correspond à une profondeur de 2 à 4 μm .

Chapitre II

Méthode de quantification des sucres par spectroscopie IR

II.1 Introduction

Comme il a été dit précédemment, les biofilms ont de caractéristique leur matrice d'exopolysaccharides. On est en droit de se demander si la quantité de sucres est aussi importante chez une souche bactérienne sous forme planctonique (ou dans une colonie sur milieux solides) que pour un biofilm. De plus, chez certaines bactéries, la présence d'une capsule polysaccharidique peut être responsable de la virulence de la souche.⁴ La quantification des sucres totaux dans différents échantillons bactériens est donc utile puisqu'il peut fournir de l'information quant à l'organisation des bactéries et à leur capacité à produire une capsule ou à participer à l'élaboration d'un biofilm.

Dans ce travail, une méthode de quantification des sucres totaux par spectroscopie IR est développée et comparée à une méthode colorimétrique conventionnelle de la microbiologie.

II.1.1 Méthodes existantes

Présentement, il existe peu de tests en microbiologie pour quantifier les sucres en fonction du nombre de bactéries dans un échantillon. Le test de Dubois et al.¹ est celui qui est le plus utilisé pour le dosage des sucres. Cette méthode permet la détermination de la concentration des sucres, des oligosaccharides, des polysaccharides et autres dérivés de sucres par un test colorimétrique où la réduction des sucres est faite avec le phénol et l'acide sulfurique. La réaction se fait sur les sucres libres et ne permet pas la détection des sucres

aminés. La solution, après avoir réagi, change de couleur (de jaune à orange-brun) et l'absorbance est mesurée à 490 nm qui correspond à l'absorption des sucres réduits. La concentration en sucres est déterminée à partir de la loi de Beer (eq. 1.1). Généralement, une standardisation externe avec un sucre de contrôle est utilisée. Bien que la méthode de Dubois et al. soit adéquate dans un contrôle analytique où les sucres analysés sont connus, cette calibration dépend considérablement du sucre choisi comme standard. Les expériences de Dubois et al.¹ montrent une dépendance considérable au type de sucre. Par exemple, pour une même masse de sucres, on obtient une absorbance de 1.0 pour le D-mannose et 0.35 pour le D-glucurone.¹ La méthode de Dubois et al. a, toutefois, été améliorée par Taylor.³³ Taylor propose d'utiliser une concentration d'acide sulfurique de 80%, ensuite de laisser réagir l'acide avec les sucres pour un minimum d'une minute, puis de refroidir à température de la pièce avant d'ajouter le phénol. Cette modification minimise les différences de réponse pour les sucres relativement simples tels que le glucose, le xylose et le fructose. Par contre, pour des sucres plus complexes (tels que l'acide D-galacturonique, myoinositol ou la cellulose), la méthode reste sensible au type de sucre.³³ Or, dans le cas d'échantillons bactériens, l'identité des sucres n'est pas toujours connue et souvent les échantillons contiennent plus d'un type de sucres (simple et complexe). La susceptibilité au genre de sucre de la méthode de Dubois et al. rend donc difficile la détermination des sucres totaux d'échantillons bactériens.

En plus d'évaluer la quantité de sucres, il est primordial de définir la quantité de bactéries dans un échantillon afin d'avoir la proportion de sucre dans la biomasse. Nous avons donc cherché des constituants qui seraient représentatifs des bactéries. Comme les protéines et l'ADN sont des constituants majeurs de toutes les bactéries, ces espèces peuvent être utilisées comme marqueurs. Par contre, un ratio sucres/protéine peut différer du ratio sucres/ADN, car la quantité de protéines ou d'ADN par bactérie n'est pas nécessairement identique pour différentes souches.³⁴ Pour quantifier les

protéines contenues dans les échantillons, la méthode de Bradford est utilisée.³⁵ Ce test permet de déterminer la quantité de protéines solubles. La méthode utilise une solution de *Coomassie[®] Brilliant Blue G-250* qui montre un maximum d'absorption à 465 nm en milieu acide, mais une fois le bleu de Coomassie lié à des protéines en solution, son maximum d'absorption passe à 595 nm.^{36,37} Le bleu de Coomassie se lie principalement avec les résidus d'acides aminés basiques et aromatiques, spécialement l'arginine.³⁷ Le test de Bradford montre donc une certaine dépendance au type de protéine. Le standard à partir duquel une courbe de calibration externe est effectuée doit donc être représentatif de la très grande variété de protéines des souches étudiées.

II.1.2 Spectroscopie IR analytique appliquée aux mélanges complexes.

La spectroscopie FTIR analytique est utilisée dans plusieurs domaines dont l'agro-alimentaire. Par exemple, des techniques analytiques par spectroscopie FTIR sont utilisées en industrie pour déterminer la quantité de lactose, de protéines et de gras dans des échantillons de lait.^{38,39} Récemment, un test de quantification de sucres connus par ATR-FTIR sur des milieux de cultures liquides pour des cellules végétales a été mis au point.⁴⁰ Dans cette approche, la consommation de sucres par les cellules est mesurée à partir des variations d'absorbance à une longueur d'onde spécifique aux sucres étudiés (le maximum d'absorbance ayant préalablement été identifié à partir des sucres purs). À l'aide de la loi de Bouguer-Beer et d'équations matricielles, les auteurs arrivent à donner les concentrations respectives des sucres restant dans le milieu après un certain temps d'exposition aux cellules.

La méthode IR qui est proposée dans ce chapitre s'appuie sur la loi de Beer comme il a été décrit dans le chapitre I. Des rapports de sucres totaux sur les protéines ou sur l'ADN sont obtenus à partir des spectres IR des échantillons. Pour tester la méthode, nous avons utilisé des solutions de produits purs, ainsi

que des mélanges modèles, représentant les bactéries, où les concentrations en protéines, en ADN et en sucres sont connues. À partir de ces mélanges, un traitement optimal des spectres a été trouvé puis testé sur des souches bactériennes.

La méthode IR permet d'estimer la quantité totale de polysaccharides dans un échantillon bactérien en se basant sur l'analyse de son spectre IR. La **figure II.1** montre les spectres d'un sucre, d'ADN et d'une protéine, où les bandes utilisées pour ce travail sont identifiées. La détermination de la quantité de polysaccharides est estimée à partir de la surface d'une bande caractéristique des sucres. La région d'élongation des liens C-O des fonctions éther et alcool située entre 970 et 1182 cm^{-1} ^{2,29} a été retenue puisqu'on y retrouve des contributions pour tous les sucres et qu'elle est relativement libre d'interférences spectrales importantes de la part des autres composants de la bactérie (**Figure II.1 A**). L'analyse du spectre IR de l'échantillon nous permet aussi d'évaluer simultanément la quantité de protéines et d'ADN. Afin d'estimer le nombre de bactéries, nous choisissons des bandes caractéristiques à l'ADN et aux protéines. Pour l'ADN, la bande de vibration antisymétrique de la fonction phosphate qui se trouve entre 1200 et 1270 cm^{-1} ^{2,29,41} est retenue parce que cette bande est une des plus intense et se trouve dans une région où il y a le moins d'interférences avec les autres composantes de la bactérie (**Figure II.1 B**). Pour les protéines, la bande Amide II, dans la région amide, est choisie comme bande caractéristique ($1560\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$) ^{2,29} parce qu'elle subit des interférences limitées (**Figure II.1 C**).

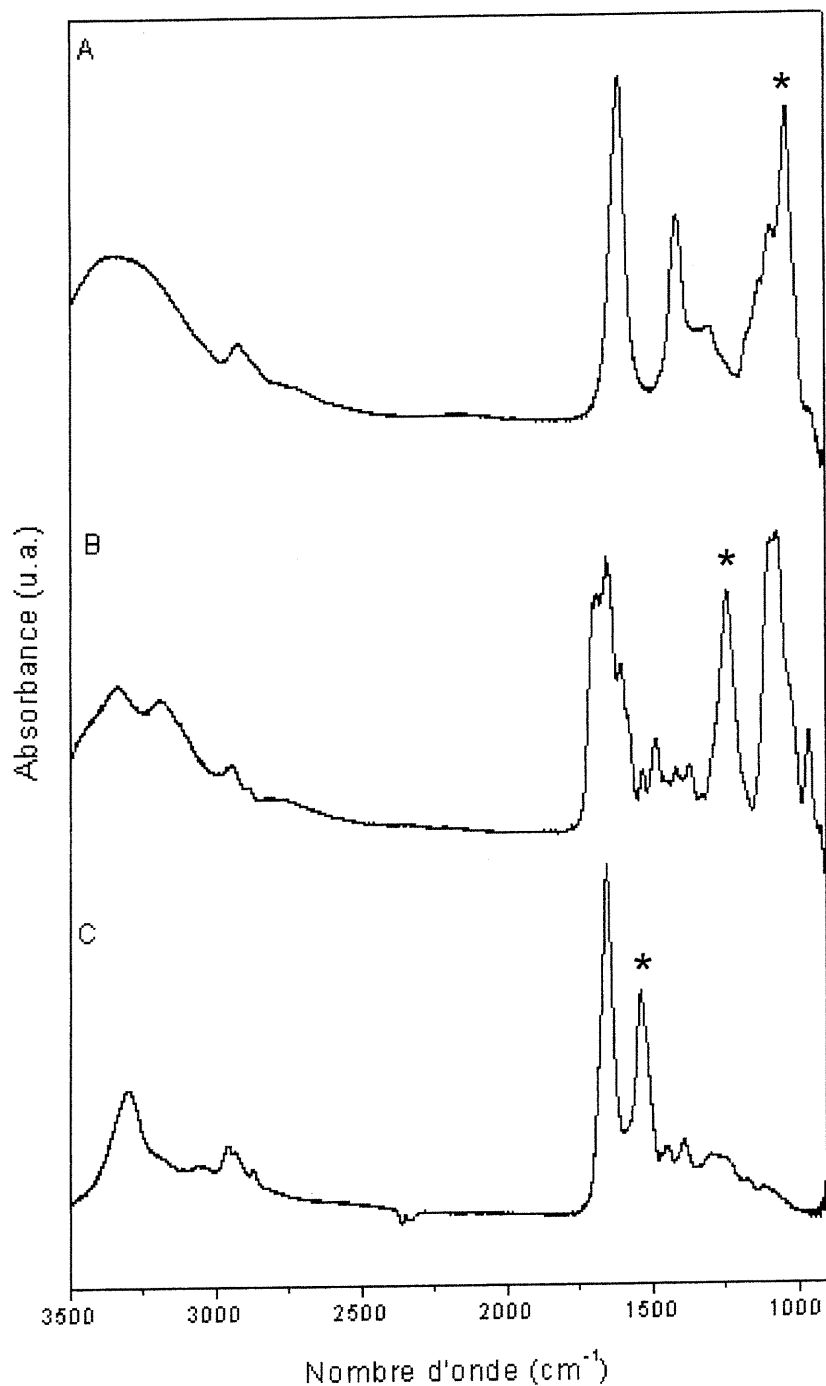


Figure II.1: Spectres IR de substances pures : A) Alginate qui est un polysaccharide, B) ADN et C) albumine qui est une protéine. Les spectres ont été pris sur des cellules de CaF_2 , à température ambiante. Les bandes caractéristiques sélectionnées sont identifiées par un astérisque.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Provenance des produits et préparation des milieux de culture

L'albumine de sérum de bovin, l'ADN (DNA type I Na salt Calf Thymus) et les cinq sucres : le sucrose, le D-lactose, l'alginate (acide alginique, sel de sodium de basse viscosité, 250 cps à 2 % en solution), xanthan (obtenue à partir de la fermentation du dextrose par *Xanthomonas campestris*) et le mannan (un exopolysaccharide produit par le *Saccharomyces cerevisiae*) proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pour le test de Dubois et al., le H₂SO₄ concentré et le phénol proviennent de chez Fisher (Fair Lawn, NJ, USA). Pour quantifier les protéines, le matériel nécessaire au test de Bradford a été acheté sous forme de kit *Protein Assay* chez Bio-Rad® (Richmond, CA, USA).

Les souches bactériennes proviennent de la réserve à -70° C du laboratoire du professeur Jean Barbeau de la Faculté de Médecine Dentaire de l'Université de Montréal. Les milieux de culture sont préparés en laboratoire, sauf pour les géloses de sang de mouton à 5% (TSA II sheep blood 5%) qui ont été achetées chez BBL® (Cockeysville, MD, USA). Les milieux de cultures sont décrits ci-dessous et chacun a été stérilisé pour une durée de 15 minutes à 121° C avec une pression de 17 psi:

Milieu TYE

17.00 g	Trypticase Peptone	BBL®
3.00 g	Yeast Extract	BBL®
5.00 g	NaCl	Fisher
2.50 g	Na ₂ HPO ₄	A&C (Montréal, QC, Canada)
1 L	H ₂ O ultra pure	

(Pour une gélose, ajouter 1.5% (g/mL) d'agar granulé)

Si un sucre doit être ajouté, il est additionné à la solution stérile à partir d'une solution concentrée qui a été stérilisée par filtration.

Milieu BHI

37.00 g Brain Heart Infusion BBL®
 1 L H₂O ultra pure
 (si en milieu solide ajouter 1.5% (g/mL) d'agar granulé)

Tampon PBS (pH = 7.2)

8.75 g	NaCl _(s)	Fisher
6.00 g	K ₂ HPO _{4(s)}	A&C
1.70 g	KH ₂ PO _{4(s)}	A&C
1L	H ₂ O ultra pure	

II.2.2 Méthode infrarouge

II.2.2.1 Préparation des échantillons

Mélanges modèles

Des solutions mères de sucres, d'albumine et d'ADN dans l'eau ultra pure sont préparées par poids de manière à connaître précisément leur concentration et conservées à 0° C. Le sucrose et le D-lactose, des sucres simples, ainsi que le mannan, l'alginate et le xanthan, des polysaccharides, sont utilisés pour assurer une plus grande diversité. Les polysaccharides choisis pour cette expérience sont des sucres naturellement produits par certaines bactéries.

Des mélanges ternaires de polysaccharides (alginate, mannan et xanthan), d'ADN et de protéines sont composés avec des rapports sucre/protéine (p/p) variant de 0.13 à 1 et sucre/ADN (p/p) de 0.13 et 2.75. Des mélanges ont été préparés à partir d'un seul ou de deux polysaccharides dans des proportions similaires à celles observées pour des échantillons bactériens. La composition des mélanges est présentée à l'**Annexe I**.

Échantillons bactériens

Pour les échantillons bactériens provenant de culture solide, quelques colonies sont prélevées et transférées dans 30 μ L d'eau ultra pure. Ces colonies sont dispersées dans l'eau par agitation mécanique. Pour les souches fraîchement prélevées, nous récoltons suffisamment de biomasse pour que le prélèvement forme un petit culot visible dans 30 μ L d'eau. L'agrégat est alors dispersé à l'aide d'un vortex.

Des échantillons où le nombre de bactéries est connu sont aussi préparés. Quatre souches bactériennes (où deux genres bactériens sont représentés) sont utilisées. Premièrement, les souches de *Streptococcus mutans* NCTC 10449 et de *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 sont inoculées chacun dans 10 mL de milieu TYE avec 0.5 % (g/mL) de glucose et sont incubées à 37° C pour 17 heures. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 et *Pseudomonas stutzeri* LSPQ 2943 sont incubés chacun dans 10 mL de milieu de BHI à 37° C pour 17 heures. Le dénombrement des bactéries/mL est obtenu à l'aide d'un hématiomètre.⁴² Les cultures bactériennes sont diluées par un facteur de 1, 0.5, 0.25 et 0.1 dans de l'eau ultra pure pour obtenir des volumes finaux de 1 mL. Un lavage des bactéries est fait pour éliminer le milieu de culture. Pour ce faire, on précipite les bactéries par centrifugation à 12 700 g pendant 5 minutes. On récolte le surnageant, puis on disperse le culot dans 800 μ L d'eau ultra pure. Cet étape est répétée trois fois. On se débarrasse de l'eau présente

dans les culots par lyophilisation. Puis, les précipités sont dilués dans 100 μL d'eau ultra pure.

II.2.2.2 Acquisition spectrale des échantillons

Tous les échantillons sont préparés de la même manière : 30 μL d'échantillon est déposé au centre d'une fenêtre de CaF_2 . La goutte est étalée pour favoriser la formation d'un film mince lors du séchage. L'eau de l'échantillon est évaporée sous faible vide (~ 1 mm Hg) créé par une trompe à eau pour une période d'environ 20 minutes. La fenêtre est placée dans le faisceau IR. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre IR à transformée de Fourier, FTS-25 de Biorad, équipé d'une source global refroidie à l'eau, d'une séparatrice de KBr et d'un détecteur de tellure de mercure-cadmium refroidi à l'azote liquide ou d'un détecteur au sulfate de triglycine deutérée. Les logiciels de GRAMS sont utilisés pour faire les différentes opérations sur les spectres. Cent balayages avec une résolution de 2 cm^{-1} sont co-additionnés pour obtenir chaque spectre. Un spectre de référence (*background*) est obtenu à partir du parcours optique libre. La contribution de la fenêtre de CaF_2 est corrigée en faisant la soustraction du spectre de la fenêtre de manière à obtenir une région plane aux alentours de 900 cm^{-1} . Nous faisons un décalage en y sur chacun des spectres en amenant à 0 le point à 1850 cm^{-1} , car il n'y a pas d'absorption à cet endroit dans le spectre. Les spectres sont ensuite traités selon le procédé développé dans le cadre de cette étude.

II.2.3 Méthode de Dubois et al.¹ – dosage des sucres

Préparation des échantillons

Nous utilisons le mannan et l'alginate comme sucres standards étant donné que ce sont des sucres provenant de bactéries. Deux mélanges de mannan ou d'alginate avec de l'albumine ont été préparés dans des rapports en poids de 1.5 (sucres/protéines). Pour obtenir les courbes de calibration, des solutions de mannan dont la concentration varie de 0.088 à 0.88 mg/mL et d'alginate dans l'eau avec des concentrations de 0.10 à 1.0 mg/mL ont été préparées. Une solution de phénol 5% (volume/volume) dans l'eau est aussi préparée.

Protocole

Nous déposons 20 μ L d'échantillon dans un puits d'une microplaque standard à 96 puits. Dans chaque puits, on ajoute 40 μ L de phénol 5% et on agite légèrement pendant 5 minutes afin de laisser le phénol réagir avec les sucres. Puis, sous une hotte, nous ajoutons rapidement 200 μ L de H₂SO₄ concentré. Il est à noter que la réaction est très exothermique. Nous laissons ensuite refroidir la plaque jusqu'à ce que son contenu soit à température de la pièce. Une lecture de densité optique (DO) est prise à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Dynatech MR5000). Chaque échantillon et le blanc sont faits en triplicata. La valeur de DO du blanc est soustraite à celle des échantillons. La valeur utilisée correspond à la moyenne des triplicatas.

II.2.4 Test de Bradford³⁵ – dosage des protéines

Préparation des échantillons

Les échantillons de polysaccharide et de protéines sont les mêmes que pour le test de Dubois et al. La courbe de calibration est obtenue à partir de standard d'albumine. Des solutions d'albumine dont la concentration varie de 0.098 à 0.98 mg/mL dans l'eau ultra pure sont préparées. Une dilution 1:5 de la solution de *Protein Assay* de Bio-Rad est préparée dans de l'eau ultra pure.

Protocole

Dix μL d'échantillon sont déposés dans un puits d'une microplaque. 200 μL de la solution de *Protein Assay* diluée à 1:5 sont ajoutés. Nous laissons réagir le réactif pour dix minutes. Le blanc est fait à partir de l'eau ultra pure. Chaque échantillon est fait en triplicata. Nous prenons ensuite une lecture de DO à une longueur d'onde de 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de Dynatech MR5000. La valeur moyenne de DO du blanc est soustraite des valeurs de DO obtenues pour les échantillons. Les concentrations en protéines des échantillons sont évaluées à partir de la droite de standards externes.

II.3 Résultats et Discussion

II.3.1 Détermination du coefficient d'absorptivité massique ϵ des sucres

Les sucres qui se retrouvent dans les souches bactériennes peuvent être sous diverses formes ce qui cause une limitation moyenne pour l'utilisation de la méthode colorimétrique proposée par Dubois et al.¹ Dans la méthode IR développée dans le présent travail, la quantification des sucres est directement reliée à leur absorptivité massique intégrée (ϵ_{sucres}) dans la fenêtre spectrale choisie (970-1182 cm^{-1}). Afin d'évaluer la dépendance de ce paramètre par rapport à la nature des sucres, nous avons mesuré ϵ_{sucres} pour 5 sucres différents : le sucrose, le D-lactose, l'alginate, le mannan et le xanthan. Dans un premier temps, des quantités de sucres connus (de 3 à 30 μg) ont été déposées sur la fenêtre pour vérifier la linéarité de la quantité de matière déposée avec l'intégration de la bande choisie. On assume alors que la goutte a formé un film mince sur la cellule de CaF_2 et que le faisceau passe à travers toute la matière. Comme l'échantillon est solide, l'absorptivité est exprimé en mg^{-1} . Les courbes ont été tracées pour le D-lactose, le sucrose et l'alginate et sont présentées à la **Figure II.2**. Il semble que le domaine de poids utilisé suit une linéarité. L'alginate montre la plus grande pente donc le ϵ_{sucres} le plus grand pour ces trois sucres. Pour déterminer les ϵ_{sucres} de tous les sucres, nous avons traité les spectres obtenus de différentes concentrations de sucre (de 4 à 8 concentration différentes). Ces résultats se retrouvent dans le **tableau II.1**. Les valeurs obtenues pour les différents sucres varient de 73 à 179 mg^{-1} , ce qui indique qu'il y a une variation dans la valeur de ϵ_{sucres} en fonction de la nature du sucre étudié. Il est possible d'élaborer une méthode semiquantitative permettant d'estimer la quantité de sucres totaux dans la biomasse. Le ϵ_{sucres} moyen est de 137 mg^{-1} avec un écart type de 43 mg^{-1} ce

qui représente une variation de 31 % entre les différents sucres. Il est à noter que cette variation est tout de même raisonnable par rapport à celle observée pour la méthode de Dubois et al. qui est pourtant couramment utilisée. En effet, comme il sera montré plus loin, la réponse au test de Dubois et al. peut varier de 100% pour deux sucres de nature différente.

Tableau II.1 : Coefficient d'absorptivité massique des sucres.

Type de sucre	Coefficient d'absorptivité (mg^{-1})
Alginate	$1.65 \pm 0.21 \times 10^2$
Sucrose	$1.16 \pm 0.31 \times 10^2$
D-Lactose	$1.51 \pm 0.35 \times 10^2$
Mannan	$0.73 \pm 0.13 \times 10^2$
Xanthan	$1.79 \pm 0.07 \times 10^2$

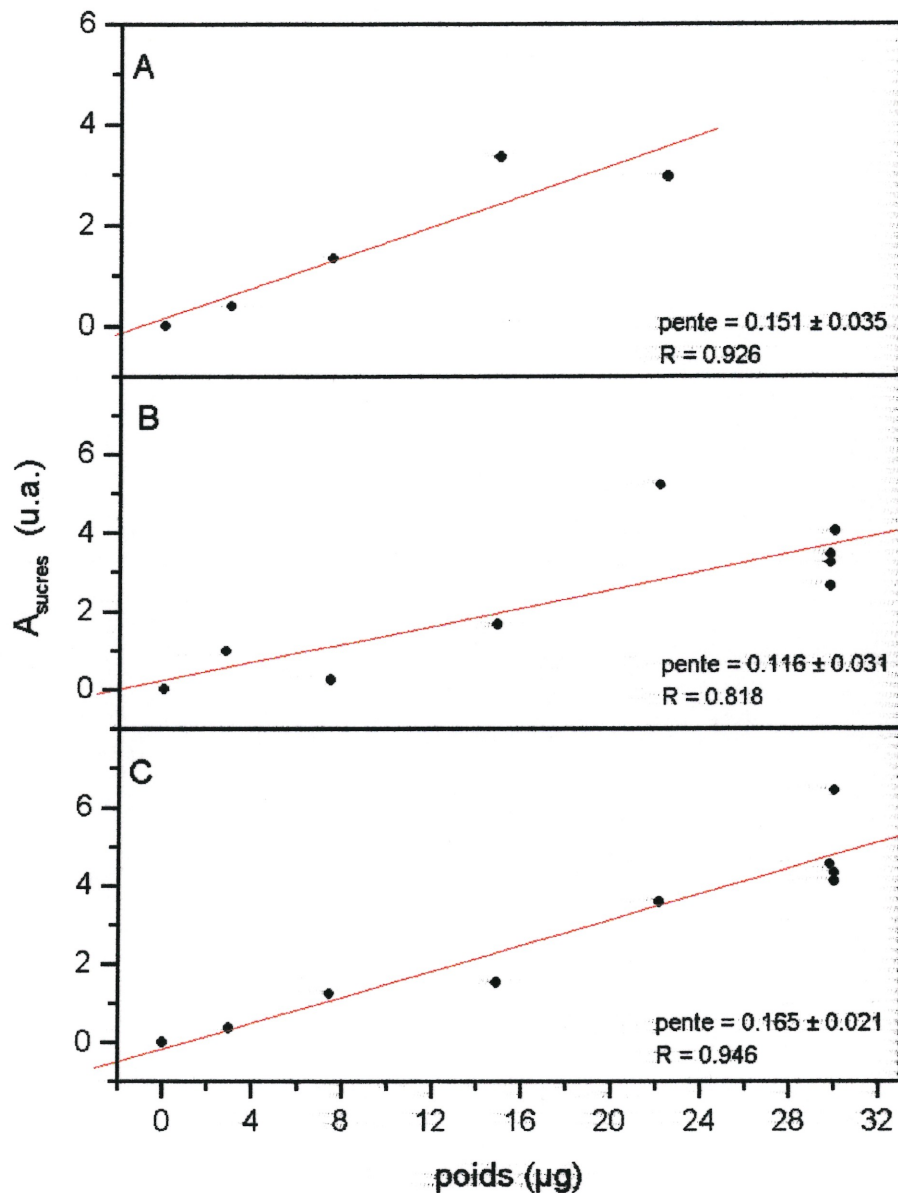


Figure II.2 : Vérification de la linéarité de la surface de bande A_{sucres} en fonction du poids de sucre déposé sur la cellule de CaF_2 avec les valeurs des pentes des régressions linéaires. A) D-Lactose B) sucrose et C) alginate.

II.3.2 Traitement des bandes IR

Comme il a déjà été mentionné, pour normaliser la quantité de sucres dans un échantillon par rapport à la quantité de bactéries, nous avons besoin d'une sonde reflétant le nombre de bactéries. Nous supposons que la quantité de protéines est représentative de la quantité de bactéries. Il est possible, dans la même ligne d'idée, d'assumer que la quantité d'ADN est, elle aussi, représentative des entités bactériennes. Nous supposons alors que la surface d'une bande caractéristique de l'ADN ou de protéines est proportionnelle à la quantité de ce produit dans l'échantillon. Nous avons utilisé cette approche pour estimer la quantité de bactéries. Un avantage important de cette méthode est la détermination de la quantité de sucres et de bactéries à partir d'un seul spectre.

La région des bandes Amide I (autour de 1650 cm^{-1}) et Amide II (autour de 1550 cm^{-1}) est reconnue pour être représentative des protéines. La position et la forme des bandes amide sont utilisées dans la détermination de structures secondaires des protéines.^{30,31} Ces bandes peuvent être utilisées comme sonde universelle des protéines étant donné la présence de la fonction amide dans le lien peptique commun à toutes les protéines. Dans la méthode proposée dans ce travail, la surface de la bande Amide II est utilisée pour estimer la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Le $\epsilon_{\text{Amide II}}$, exprimé en poids, montre une dépendance limitée à la structure secondaire des protéines.³⁰ De plus, cette région du spectre de protéines subit peu d'interférences des autres composantes des bactéries. La bande Amide I est généralement plus intense, mais certains polysaccharides, comme l'alginate, montrent une bande assez intense due à la vibration d'élongation C=O à 1610 cm^{-1} ²⁹ et celle-ci interfère avec la bande Amide I.

Une procédure systématique a été développée afin de calculer l'aire de la bande tout en minimisant les différentes interférences au niveau de la bande

Amide II. Cette procédure permet de déterminer la surface de la bande Amide II de manière reproductible et à toutes fins pratiques insensible à la présence de polysaccharides qui interfèrent dans cette région. Tout d'abord, un polynôme d'ordre 4 est déterminé par moindres carrés à partir des valeurs d'absorbances aux nombres d'onde suivants : 1800, 1789, 1778, 1767, 1755, 1480, 1474, 1468, 1462 et 1456 cm^{-1} . Ce polynôme corrige pour la ligne de base de 1800 à 1755 cm^{-1} et élimine la contribution des bandes adjacentes à la bande Amide II en deçà de 1480 cm^{-1} . Ensuite, nous faisons une simulation du signal avec trois bandes de forme mixte Lorentzienne et Gaussienne dans la région spectrale de 1722 à 1522 cm^{-1} . Certaines restrictions sur les bandes ont été imposées pour orienter la solution mathématique. Premièrement, la position de la première bande est limitée entre 1650 et 1660 cm^{-1} parce que les spectres de bactéries enregistrés lors de ce travail ont toujours montré une bande Amide I dans cette région. Cette position correspond principalement à des protéines en hélice α ou de structures désordonnées.³⁰ Ces structures semblent donc être les plus abondantes chez les bactéries. La deuxième bande correspondant à la bande Amide II des protéines est limitée en position entre 1560 et 1530 cm^{-1} . La position de la dernière bande est limitée de 1700 à 1550 cm^{-1} . Cette plage correspond à peu près à la totalité de la région moins la région Amide II de manière à éviter que la contribution Amide II soit simulée avec 2 composantes. Cette troisième bande est essentielle pour reproduire des signaux associés aux sucres (par exemple l'alginate possède une bande importante à 1601 cm^{-1}) et de l'ADN. Cette bande n'est donc significative que dans certain cas et représente seulement 6 (± 3) % de l'aire totale pour un spectre de protéine pure. Une largeur maximale de 70 cm^{-1} a été imposée à la dernière bande afin d'éviter des simulations déraisonnables. À la **figure II.3**, nous montrons le résultat de la simulation d'un spectre d'un échantillon bactérien. On peut voir que la courbe résiduelle est presque plane et donc que la simulation est bonne. Pour évaluer la reproductibilité du traitement des bandes amide, nous avons comparé la surface de la bande Amide II par rapport à la surface totale des trois bandes pour cinq échantillons

indépendants d'albumine avec des quantités différentes déposées sur la fenêtre. Nous obtenons une valeur de 30.7 (\pm 2.7) % pour la surface relative de la bande Amide II. Ces résultats suggèrent que la reproductibilité de la simulation est acceptable.

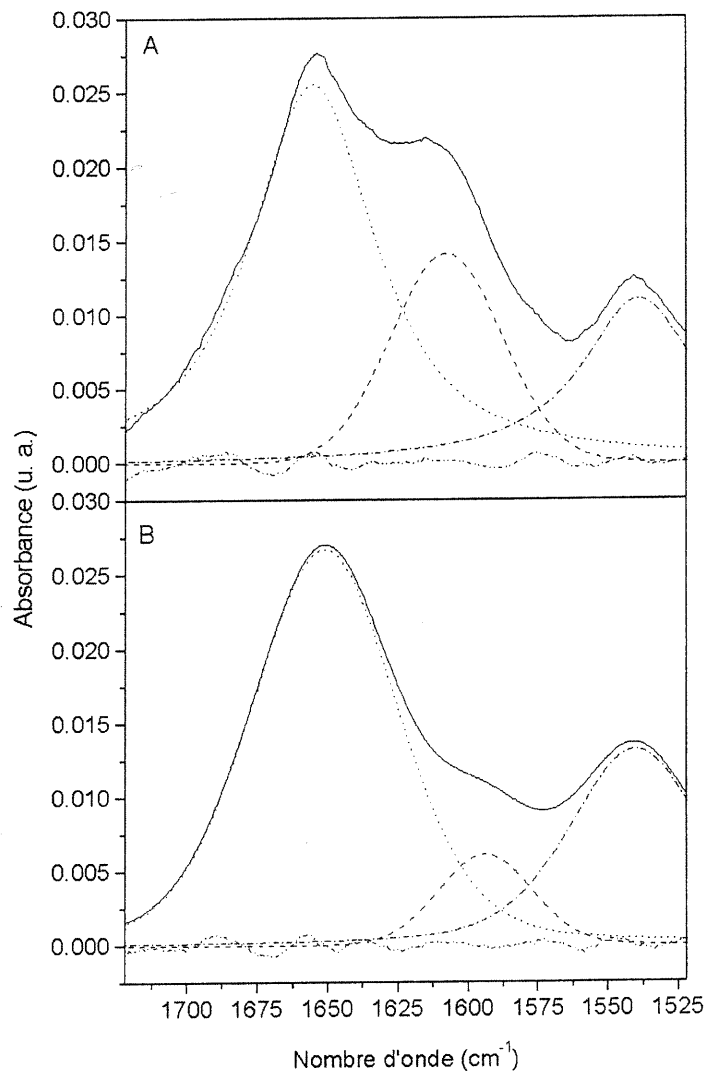


Figure II.3 : Simulation de la bande Amide II du spectre IR de A) un mélange de alginate:albumine:ADN (1:1:0.75) et B) *Streptococcus mutans*. Le spectre original est en trait plein. La bande Amide I est représentée en pointillé, la bande Amide II en trait et pointillé et la troisième bande qui correspond aux interférences des sucres et de l'ADN est représenté en petit trait. La ligne dans le bas est la ligne résiduelle entre les bandes simulées et le spectre.

Malgré le fait que les régions sélectionnées soient caractéristiques des espèces moléculaires, certaines interférences sont inévitables dans le cas d'échantillons complexes. En regardant de plus près les spectres d'ADN, de sucre et de protéines (**Figure II.1**), nous avons remarqué que l'ADN subit une interférence de la part des protéines dans sa fenêtre spectrale caractéristique. Certains acides aminés ont des amines tertiaires ou secondaires dans leurs chaînes latérales.⁴³ et celles-ci peuvent générer un signal dans la région de $1300-1100\text{ cm}^{-1}$ ²⁹ et ainsi créer une interférence avec l'ADN. De plus, certaines bandes associées au groupement alcool des sucres interfèrent aussi dans la fenêtre de l'ADN. Par exemple, l'élongation des liens C-OH des alcools secondaires est observée dans la région de $1350-1250\text{ cm}^{-1}$.² Nous avons établi une méthode pour déterminer la surface de la bande d'ADN tout en minimisant les interférences dans la région attribuée à l'ADN en recourant à des simulations de bandes, comme dans le cas des protéines. Dans la fenêtre spectrale allant de 1320 à 1190 cm^{-1} , deux bandes sont simulées (**Figure II.4**).

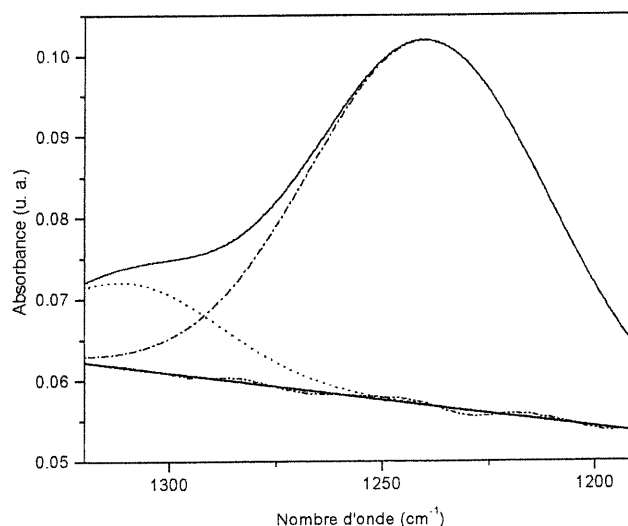


Figure II.4 : Simulation de la bande ADN sur un spectre IR de *Streptococcus mutans*. Le spectre original est en trait plein. La bande ADN est représentée en trait et pointillé. La bande correspondant au signal d'interférence est montrée en pointillé. Dans le bas, la ligne résiduelle entre les bandes simulées et le spectre est montrée en trait point-point ainsi que la ligne de base linéaire en trait plein.

Comme nous cherchons à isoler la bande de l'ADN se situant à 1240 cm^{-1} , le maximum d'une bande Gaussienne est contraint de 1235 à 1245 cm^{-1} avec une largeur maximale de 70 cm^{-1} . La deuxième bande de forme mixte Gaussienne-Lorentzienne n'a aucune restriction. La simulation inclut aussi une ligne de base linéaire. Avec ce traitement, la ligne de base simule la contribution des protéines dans cette région, alors que la deuxième bande simule la contribution des sucres et se retrouve généralement près de 1290 cm^{-1} . Nous obtenons, de cette manière, l'aire d'une bande vers 1240 cm^{-1} que nous associons à la bande ADN.

Parallèlement, nous avons observé que l'ADN interfère aussi dans la fenêtre spectrale des sucres (entre 970 et 1182 cm^{-1}). Cette contribution est due au groupement ribose qui constitue une unité répétitive dans le squelette de l'ADN.⁴¹ Lorsque nous portons en graphique le rapport $A_{\text{sucres}}/A_{\text{ADN}}$, où A_{sucres} est l'aire dans la région sucre et A_{ADN} est la surface de la bande ADN trouvé par le traitement décrit plus haut, en fonction des rapports en poids sucres/ADN des mélanges modèles (voir Annexe I), nous trouvons une ordonnée à l'origine de 4 ± 1 . Ceci indique donc que, lorsqu'il n'y a pas de sucres dans l'échantillon, un signal dont l'aire est équivalent à 4 fois l'aire de la fenêtre d'ADN est observé dans la fenêtre des sucres. Sur le spectre de l'ADN pur, le ratio $A_{\text{sucres}}/A_{\text{ADN}}$ est effectivement de 3.0 ± 0.3 . Cette contribution est corrigée de la manière suivante:

$$A_{\text{sucres}_c} = A_{\text{sucres}} - (4 \times A_{\text{ADN}}) \quad (\text{éq. 2.1})$$

Où A_{sucres_c} est la surface dans la régions des sucres corrigée pour la contribution de l'ADN.

Afin de vérifier si la méthode de traitement spectral proposée plus haut est adéquate pour quantifier les sucres en fonction des protéines ou de l'ADN dans un échantillon donné, nous avons préparé des mélanges ternaires avec

différents ratios en poids et différents types de polysaccharides avec de l'albumine et de l'ADN (voir **Annexe I**). De chaque spectre, $A_{\text{Amide II}}$, $A_{\text{Sucre}}_{\text{sc}}$ et A_{ADN} ont été déterminées et la **Figure II.5** montre le rapport $A_{\text{Sucre}}_{\text{sc}} / A_{\text{Amide II}}$ en fonction du rapport en poids des sucres sur les protéines. La droite obtenue donne une corrélation de 0.72. Le rapport $A_{\text{Sucre}}_{\text{sc}} / A_{\text{ADN}}$ en fonction du rapport en poids des sucres sur l'ADN montrent une corrélation de 0.80. Ces corrélations moins élevées que celles normalement observées pour des méthodes de quantification chimique sont principalement associées à l'approximation faite sur les ϵ_{sucres} . En effet, nous avons vu que la variation de ϵ_{sucres} était d'environ 27% d'après nos mesures. Cependant, comme nous le verrons plus loin, ces corrélations sont raisonnables par rapport à ce qui est observable avec les méthodes actuellement utilisées. Ces résultats montrent qu'il est possible d'évaluer la composition en sucre dans un échantillon modèle avec une certaine précision.

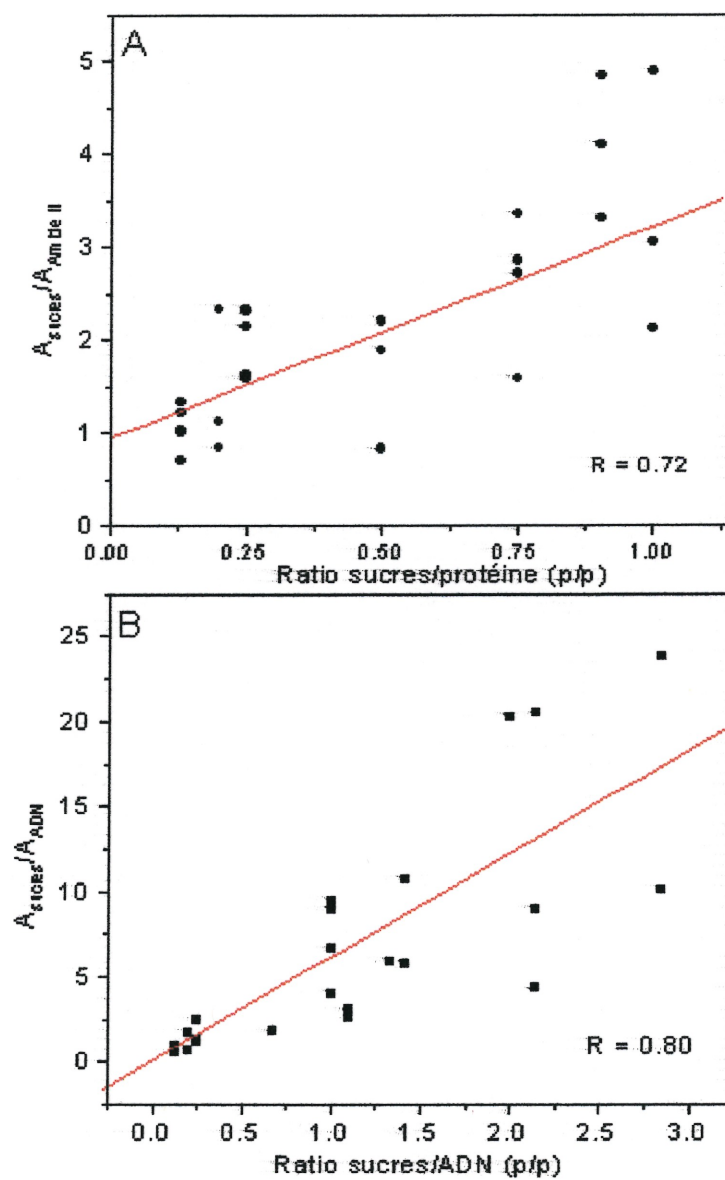


Figure II. 5 : Rapports de l'aire des bandes caractéristiques obtenue par la méthode IR pour les mélanges modèles en fonction de leurs rapports en poids.

II.3.3 Comparaison de la méthode IR versus la méthode de Dubois et al. et de Bradford.

Nous avons déjà mentionné que la méthode de Dubois et al. présente une grande dépendance à la nature des sucres. Pour illustrer la dépendance de chacune des méthodes, nous avons fait la détermination du contenu en sucre par rapport à la quantité de protéines de deux échantillons modèles par la méthode IR (en utilisant le ratio sucre/protéine) et par celle de Dubois et al. et de Bradford. Les deux échantillons possèdent le même rapport sucres/protéines, soit 1.5 (p/p) ce qui peut être comparable à ce que l'on retrouve dans un échantillon bactérien riche en sucre. Dans le premier échantillon, nous avons utilisé le mannan et l'albumine, dans l'autre, l'alginate et l'albumine. Les résultats de ces essais sont rapportés dans le **Tableau II.2**.

Tableau II.2 : Détermination du rapport sucres/protéines d'échantillons modèles par la méthode colorimétrique de Dubois et al. et de Bradford et la méthode IR.

Échantillon	Rapport obtenu par pesée (p/p)	Dubois/Bradford (p/p)		Rapport IR (p/p)
		Mannan	Alginate	
mannan et albumine	1.524 ± 0.001	1.15 ± 0.13	5.1 ± 0.6	1.16 ± 0.07
alginate et albumine	1.524 ± 0.001	0.268 ± 0.002	1.22 ± 0.10	1.62 ± 0.18
Moyenne	1.524 ± 0.001	1.9 ± 2.1		1.39 ± 0.3
Écart type relatif (%)		110%		23%

Le résultat de la méthode colorimétrique est exprimé en fonction de la courbe d'étalonnage externe obtenue avec du mannan et de l'alginate. Nous avons fait le test à l'aveugle et nous avons calculé le contenu en sucre de chacun des

échantillons avec les deux courbes. Les résultats de ces calculs sont donnés au **Tableau II.2** et sont donné en rapport de poids. Pour la méthode IR, les rapports de surface de bande nous ont permis d'obtenir le rapport en poids de l'échantillon à partir de la courbe montrée à la **Figure II.5 A**. La reproductibilité de la méthode peut être évaluée par les écarts types relatif qui sont données dans la dernière ligne du **Tableau II.2**. Dans le cas de la méthode IR, nous obtenons une moyenne de 1.38 avec un écart type de 0.6. L'écart type relatif est de 23%. Dans le cas de la méthode par colorimétrie, puisque la réponse dépend du type de sucre de façon plus prononcé, l'écart type relative est de 110%. Ceci démontre l'applicabilité limitée de cette méthode à des échantillons dont le type de sucre n'est pas identifié ou encore dans le cas d'un mélange de sucres. De plus, lorsque la bonne courbe de calibration est utilisée, les méthodes de Dubois et al. et de Bradford donnent tout de même un écart de 23 % et 18 % avec la valeur attendue. Ceci est peut-être dû au fait que la méthode de Dubois et al. détecte les sucres libres¹; l'albumine pourrait s'associer avec les sucres, comme il a été observé pour d'autres protéines,⁴⁴⁻⁴⁶ et pourrait les empêcher de réagir adéquatement. Ce phénomène est d'autant plus susceptible de se produire dans un échantillon bactérien. Dans le cas de la méthode IR, l'analyse systématique et objective des spectres conduit à un minimum des interférences possibles.

II.3.4 Application de la méthode à des échantillons bactériens

Une fois la méthode éprouvée à partir de mélanges modèles, il est important d'examiner son comportement avec des échantillons bactériens réels. Dans un premier temps, nous avons comparé la reproductibilité de la méthode pour une même souche dans des conditions de croissances définies, puis nous avons appliqué la méthode sur des échantillons sous forme planctonique et de biofilm. Finalement, nous avons exploré les possibilités de définir de manière

quantitative la quantité de sucres par bactérie dans un même genre bactérien à l'aide de la méthode.

Tout d'abord, les spectres obtenus pour les mélanges modèles sont comparables à ceux obtenus pour des échantillons bactériens. La **Figure II.6 A** montre le spectre d'un mélange modèle d'alginate, d'albumine et d'ADN (0.75:1:0.75). Il est possible de remarquer les similitudes avec les spectres de bactérie montrés en **B** et en **C**. En effet, les bandes Amide II, ADN et sucres identifiées précédemment se retrouvent dans chacun des trois spectres. Ceci vient renforcer la validité des mélanges modèles utilisés dans cette étude. Dans un premier temps, nous avons étudié la reproductibilité de la méthode pour différents échantillons de bactéries. Pour chaque souche, trois échantillons ont été préparés à partir de trois colonies prise de la même gélose et la méthode IR a été appliquée sur chacun des échantillons de façon indépendante. Les résultats pour trois souches différentes sont donnés dans le **tableau II.3 a, b et c**.

Tableau II.3 : Rapports de sucres en fonction des protéines ou de l'ADN pour différents échantillons bactériens.

Souches	$A_{\text{sucres}}/A_{\text{Amide II}}$	$A_{\text{sucres}}/A_{\text{ADN}}$
a- <i>Micrococcus luteus</i>	1.11 ± 0.10	4.5 ± 0.7
b- <i>Bacillus subtilis</i>	0.99 ± 0.08	4.0 ± 1.1
c- <i>Streptococcus mutans</i>	1.30 ± 0.18	2.4 ± 0.6
d- Biofilm de <i>Streptococcus mutans in vitro</i> *	5.4	35.6
e- Plaque supragingivale <i>in vivo</i>	2.9	7.9
f- Plaque supragingivale cultivée sur gélose sang	0.66	3.2

* référence chapitre III

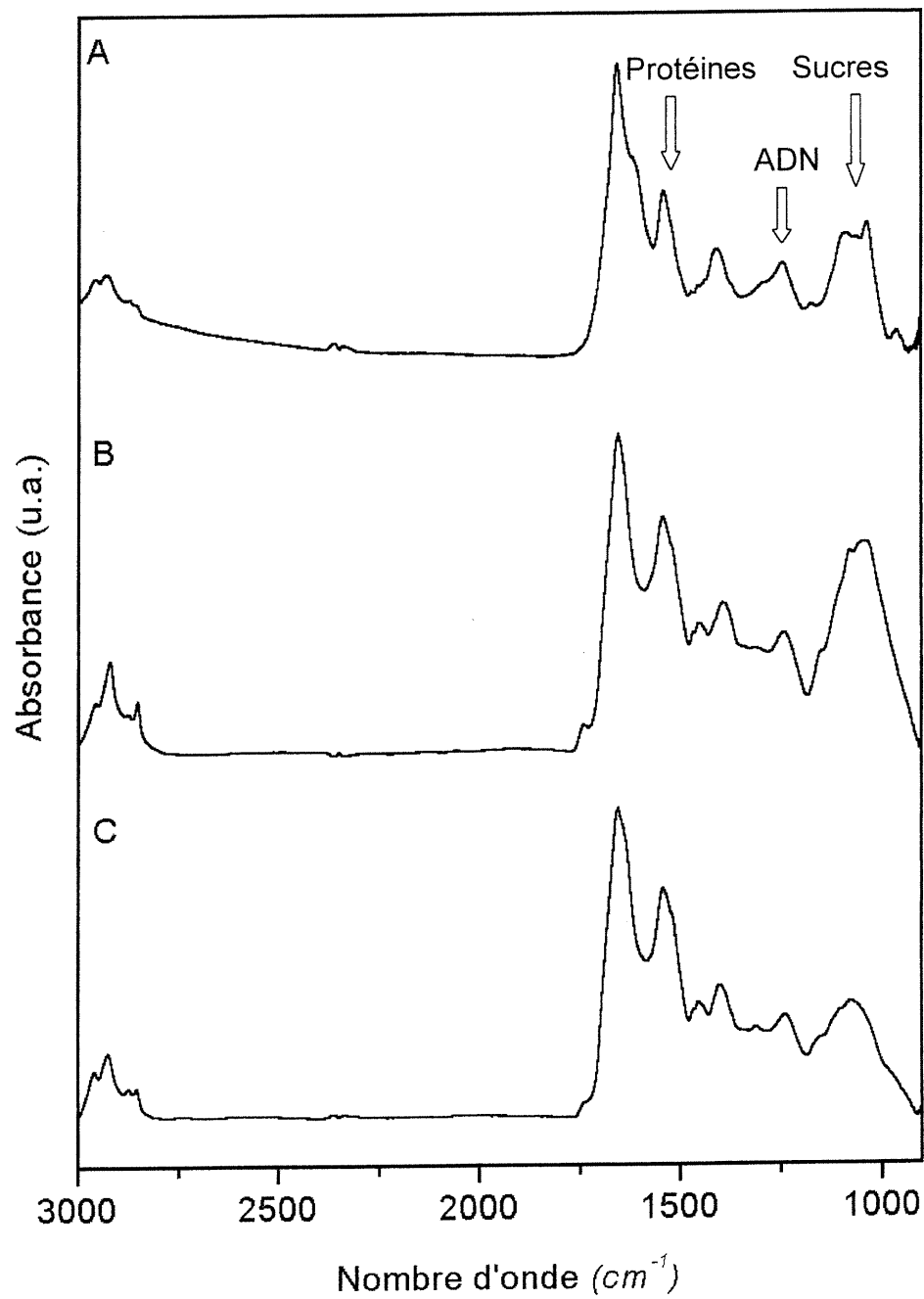


Figure II.6 : Spectres IR A) d'un mélange modèle composé d'alginate, d'albumine et d'ADN (0.75:10.75). B) de plaque dentaire supragingivale prélevée de manière *in vivo* sur les incisives d'un volontaire et C) de plaque dentaire qui a poussée sur gélose sang à 37° C.

Pour les rapports de sucres en fonction des protéines, nous trouvons une déviation standard relative moyenne de 10% pour les trois souches. Pour ce qui est du rapport des sucres/ADN, nous trouvons une déviation standard relative moyenne de 22%. La reproductibilité est plus faible dans le cas du rapport avec l'ADN, car la bande ADN est généralement beaucoup plus petite et donc plus sensible aux différentes interférences des autres bandes et l'imprécision attachée à sa surface est certainement plus grande. On peut donc conclure que les rapports dérivés des spectres IR sont relativement semblables pour des échantillons similaires. Les résultats indiquent que les souches les plus riches en sucres ne sont pas les mêmes si on exprime la quantité de sucre en fonction du contenu en ADN ou de protéines. En fait, la composition en protéines et en ADN varie d'une souche à l'autre³⁴ et ces quantités ne permettent pas d'évaluer le nombre de bactérie ou la quantité de biomasse comme nous le verrons plus loin. Les différents rapports reflètent donc également la composition relative en ADN et protéine des différentes souches.

Un exemple d'application de la méthode sur des échantillons bactériens est la comparaison d'une souche qui a poussé dans des conditions favorisant la forme biofilm *versus* la souche après croissance sur gélose, des conditions qui ne conduisent pas à la forme biofilm. Le **tableau II.3 d, e et f** donne les rapports obtenus pour un biofilm de *Streptococcus mutans*, de la plaque dentaire supragingivale *in vivo*, prélevée sur les incisives inférieures, et de cette même plaque cultivée sur gélose sang. Si nous appliquons la méthode à un spectre de biofilm de *Streptococcus mutans* obtenu *in vitro*, nous remarquons un très grand rapport en sucres sur les protéines ou l'ADN. *Streptococcus mutans* sous forme de biofilm montre un plus grand enrichissement en sucres si on l'exprime en fonction de l'ADN (15 fois) relativement au rapport en fonction des protéines (4 fois). Cette souche produit aussi des glycoprotéines qui jouent un rôle dans l'adhésion et qui mène à la forme d'un biofilm.⁸ Donc la matrice contient une fraction considérable de

protéines, ce qui amortit l'enrichissement en sucres décrit par le rapport sucres/protéines. Il y a environ de deux à quatre fois plus de sucres produits dans la plaque *in vivo*, c'est-à-dire sous forme de biofilm, que sur gélose sang. La simple inspection visuelle des spectres bruts (**Figure II.6 B et C**) permet de voir cette différence en regardant la bande reliée aux sucres dans la région spectrale allant de 970 à 1182 cm^{-1} . Cette différence s'expliquerait par la grande production d'exopolysaccharides par les bactéries lorsqu'elles se retrouvent sous forme de biofilm. Les autres régions du spectre ne varient pas significativement. Ces résultats viennent supporter l'hypothèse que la matrice dans un biofilm est très riches en sucres.^{8,11,22}

Nous avons examiné si la méthode était applicable à travers les genres bactériens. Nous avons déjà mentionné que la spectroscopie IR est utilisée en taxinomie pour les bactéries. Ceci implique qu'il est possible de trouver des différences dans les spectres d'une souche à l'autre. Cependant, tous les spectres de bactéries enregistrés montrent beaucoup de points en commun. Les principales composantes moléculaires, malgré des variations en nature et en proportions, demeurent quand même toujours de même famille. Pour examiner comment les paramètres extraits par la méthode IR sont comparables d'une souche à l'autre, nous avons relié la surface de la bande Amide II ou de la bande ADN en fonction du nombre de bactéries déposées sur la fenêtre de CaF_2 (**Figure II.7**). Il en ressort que pour le même genre bactérien, nous obtenons une bonne corrélation entre la surface de bande Amide et la fenêtre ADN *versus* le nombre de bactéries. Il est donc possible d'utiliser les paramètres pour évaluer le nombre de bactéries dans un échantillon, et alors, de procéder à l'étude semiquantitative de production de sucre pour un même genre bactérien. Par contre, il y a une différence assez marquée au niveau des intensités de bandes lorsqu'on compare deux genres bactériens. Ceci peut être expliqué par le fait que les *Pseudomonas* sont de plus grosses bactéries par rapport aux Streptocoques. Comme les bactéries sont plus grosses, ceci implique une plus grande quantité de constituants par

bactéries tel que les protéines par exemple. C'est pourquoi nous retrouvons une bande Amide II plus intense pour les *Pseudomonas* pour un nombre donné de bactéries par rapport aux Streptocoques.

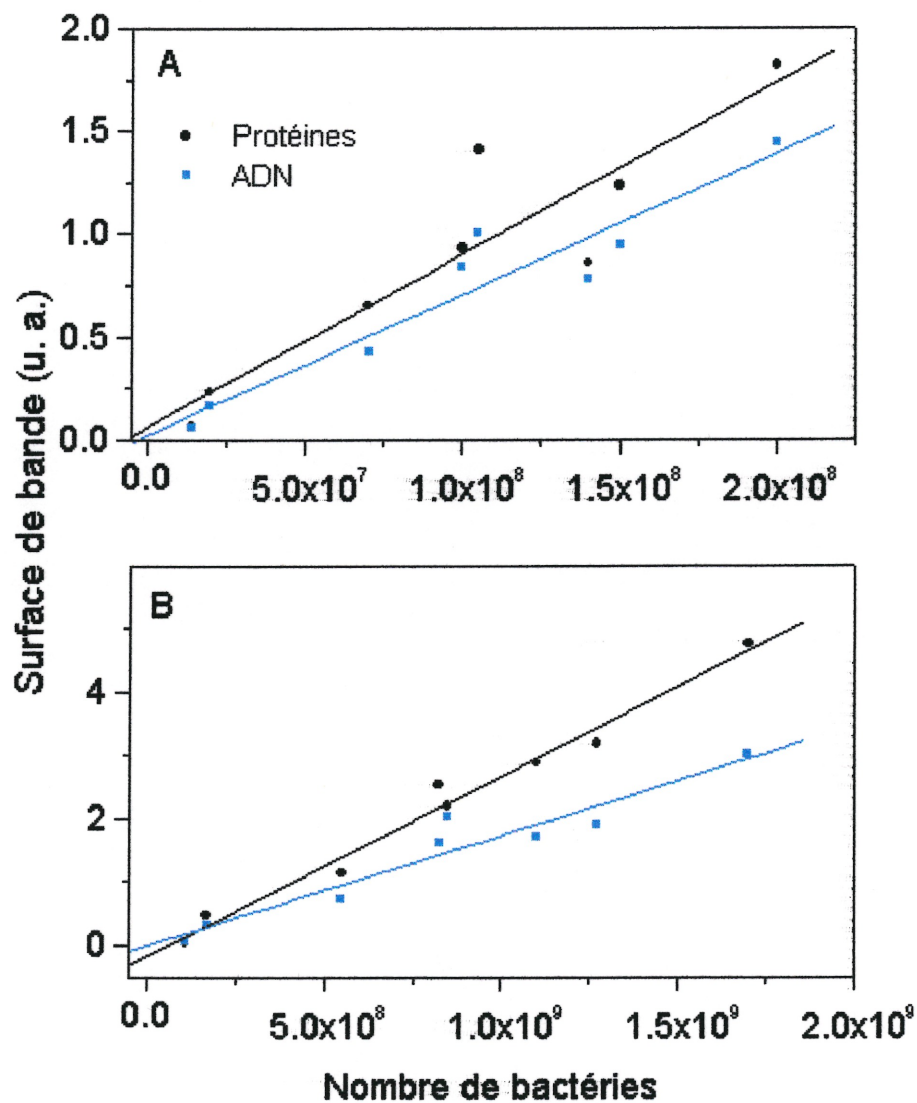


Figure II. 7 : Comparaison de deux genres bactériens en utilisant l'aire de la bande ADN et protéine obtenue à partir de la méthode IR en fonction du nombre de bactéries déposées sur la fenêtre de CaF₂. A) Genre *Pseudomonas* et B) genre *Streptococcus*. Les traits pleins montrent les régressions linéaires des séries de données.

II.4 Conclusion

Dans ce travail, nous avons mis au point une méthode semiquantitative par spectroscopie IR qui permet d'estimer les sucres totaux dans un échantillon bactérien. Les limites de la méthodes sont dues aux ϵ_{sucres} qui dépendent du type de sucres présents dans l'échantillon. En effet, un ϵ_{sucres} moyen de 137 mg^{-1} avec un écart type relatif de 31% à été trouvé pour les cinq sucres étudiés dans ce travail. Par contre, cette dépendance est limitée si on la compare à celle du test de Dubois et al. Dans le cadre où nous voulons quantifier la matrice d'un biofilm, l'indépendance au type de sucre est très importante, car la matrice est généralement composée de plus d'un sucres dont on ne connaît pas l'identité. La méthode s'appuie sur des rapports d'aire de bandes associées aux sucres, aux protéines et à l'ADN. Les rapports sont faits en considérant les diverses interférences pouvant avoir lieu dans le spectre, et un traitement des bandes systématique et objectif a été déterminé à partir de mélanges modèles. La correction systématique des interférences n'est évidemment pas complète et peut être une source d'erreur dans la méthode. Notre méthode se veut rapide et requiert peu d'échantillon; nous obtenons l'information voulue à partir d'une seule mesure sur un échantillon qui subit un minimum d'opérations avant l'analyse. De plus, nous pouvons appliquer cette méthode sur tous les genres de cultures bactériennes de manière qualitative, et dans un même genre bactérien, il est possible d'obtenir une information semiquantitative sur la production de sucre par bactérie.

Chapitre III

Diffusion de détergents dans un biofilm de *Streptococcus mutans* par spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée.

III.1 Introduction

Comme il été mentionné au chapitre I, les biofilms présentent une résistance aux bactéricides. D'ailleurs, le problème de récurrence des biofilms suscite beaucoup d'intérêts et demeure un point chaud en recherche.²⁰ L'accès de l'antibiotique aux cellules bactériennes est limité dans un biofilm comparativement aux cellules sous forme planctonique. Dans le cadre d'un traitement antibiotique, le traitement s'avère superficiel si la matrice protège les bactéries qui se trouvent profondément dans la biomasse. Une fois le traitement terminé, les bactéries qui n'ont pas été atteintes par l'antibiotique forment à nouveau un biofilm. Dans le cadre de ce travail, nous avons examiné si la diffusion limitée d'agents bactéricides à l'intérieur d'un biofilm pourrait être à l'origine de la résistance de ces derniers aux antibiotiques.

Dans une première étape, nous avons trouvé les conditions de croissance et de maintien d'un biofilm de *Streptococcus mutans* dans une cellule à réflexion totale atténuée (*Attenuated Total Reflection ATR*). *Streptococcus mutans* a été retenu pour son implication dans la plaque dentaire qui est un exemple de biofilm. La spectroscopie IR par ATR nous permet d'étudier *in situ* la croissance du biofilm. Une fois le biofilm obtenu, nous suivons la pénétration de différents types de détergents qui sont utilisés comme bactéricides dans les rince-bouche et les dentifrices. Nous voulons comprendre les facteurs influençant leur diffusion sur notre modèle de plaque dentaire.

III.1.1 *Streptococcus mutans*

La cavité buccale est, à elle seule, un écosystème complexe. On y retrouve plus de 300 espèces différentes de bactéries.^{8,47} La plaque dentaire, que l'on retrouve au-dessus de la gencive (supragingivale) comme au-dessous de la gencive (sousgingivale), est composée de diverses bactéries, dont les streptocoques.⁴⁷ Les streptocoques sont des coques qui se divisent dans un plan et qui se séparent difficilement après la division cellulaire.⁸ Cette résistance à se séparer leur donne une forme de chaînette.⁸ Les streptocoques sont l'espèce la plus abondante de la flore buccale. Par contre, *Streptococcus mutans* se retrouve majoritairement dans la plaque dentaire et est un des principaux responsables de la carie dentaires.^{8,10,47}

Streptococcus mutans possède plusieurs glycosyltransférases qui sont des enzymes qui sectionnent les sucres complexes pour les transformer soit en source d'énergie, soit en réserve d'énergie.^{8,10,47} Les cellules bactériennes peuvent emmagasiner des réserves de polysaccharides intracellulaires.⁴⁸ Une des glycosyltransférases des streptocoques produit aussi des polysaccharides extracellulaires sous forme de glucan et de fructan.^{10,47,48} Le fructan est un polymère de fructose avec des liens β (2-6) et β (1-2).⁴⁸ Il sert de réserve d'énergie.⁸ Le glucan, pour sa part, est un polymère de sucrose qui peut prendre plusieurs formes. Il peut être hydrosoluble ou hydrophobe.^{8,10,47,48} Son caractère hydrophobe découle de l'abondance de liens α (1-3) glucose.⁴⁸ Le glucan produit par *Streptococcus mutans* est composé d'entre 30 et 87% de liens α (1-3) glucose ce qui donne un polymère ramifié et peu soluble.^{8,10} C'est ce polymère qui, avec la présence de glycoprotéines, procure à la bactérie une adhérence à la surface des solides.^{10,47} Le glucan forme aussi une matrice qui enveloppe les bactéries et les retient entre elles.

Streptococcus mutans forme des agrégats lorsqu'il croit en présence de sucrose (un sucre double) alors que s'il est cultivé en présence de glucose (un

sucres simple), il forme des chaînettes isolées. Ce phénomène est dû à la présence de glycosyltransférases. Le glucan qui est produit en présence de sucrose provoque l'association des chaînettes.

III.1.2 Méthode infrarouge par réflexion totale atténuée

Il est possible de suivre *in situ* l'évolution d'un échantillon qui se trouve à la surface du cristal ATR. De cette manière, il nous est possible de suivre la croissance d'un biofilm ou encore la diffusion de tensioactifs dans le biofilm qui s'est formé sur le cristal ATR.^{26-28,49,50}

Dans une cellule à flot, les bactéries qui adhèrent au cristal se trouvent dans le parcours optique du faisceau IR. Les bactéries se multiplient et couvrent de plus en plus le cristal ce qui se traduit dans le spectre comme une croissance des bandes. Une fois que la biomasse a rempli l'espace balayé par l'onde évanescente, un arrêt de la croissance des bandes dans les spectres s'effectue. Si la croissance bactérienne se poursuit au delà de cette section, elle n'est pas détectée par le faisceau IR. Il est important de noter que les sucres qui sont emmagasinés dans les cellules sont détectés, car le faisceau IR passe à travers la biomasse et ne fait pas de distinction entre ce qui se trouve à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Comme il a été démontré au chapitre II, un signal IR est enregistré pour tous les sucres qui sont présents dans l'échantillon. Dans le cadre de la formation d'un biofilm, plus la production d'exopolysaccharides (comme le glucan et le fructan) sera grande, plus le signal IR dans la région des sucres ($1180-970\text{ cm}^{-1}$) sera intense selon la loi de Beer tel que décrite dans le chapitre I.

Il est aussi possible d'utiliser cette approche pour étudier la diffusion de molécules dans le biofilm. Les molécules qui se trouvent dans la solution surnageant le biofilm migrent à travers la matrice d'exopolysaccharides. Tant

que la molécule diffusante n'a pas atteint l'onde évanescente, la molécule ne peut être détectée. Par contre, dès que la molécule atteint le faisceau IR et que sa concentration est suffisante pour être détectée, son spectre s'additionne à celui du biofilm. Plus la quantité de produit diffusant se trouve au niveau de la d_p , plus son spectre augmente en intensité. Il est alors possible de dresser le profil de diffusion en traçant la surface d'une bande correspondant au produit de diffusion en fonction du temps.

III.1.3 Facteurs qui influencent la diffusion

La diffusion dans les biofilms a déjà été étudiée selon diverses méthodes. À l'aide de membrane de dialyse, il a été observé que la présence d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ralentissait la diffusion d'un antibiotique⁵¹ La pénétration de molécules d'oxygène²⁰ et d'ions⁵² a été étudiée à l'aide de microélectrodes et s'est révélée difficile au centre des microcolonies d'un biofilm. Aussi, la diffusion de soluté s'est révélée lente dans le biofilm selon une étude par spectroscopie de fluorescence via un microscope confocal à balayage.⁵³

On peut imaginer la diffusion comme un mouvement aléatoire des molécules. Dans le cas où il y a existence d'un gradient de concentration, le mouvement global des particules se fait de la section concentrée vers la moins concentrée. Ce principe est décrit par la première loi de Fick. L'application de cette théorie se fait bien pour les milieux homogènes, cependant, les biofilms sont hétérogènes ce qui rend difficile l'application d'un modèle mathématique exact pour décrire la diffusion dans ce système. Mais, si nous posons l'hypothèse qu'un biofilm ressemble à une couche homogène et que la diffusion est égale sur l'ensemble de l'espace balayé par le faisceau IR, alors la diffusion de particules dans le biofilm suit la deuxième loi de Fick et on peut appliquer l'équation suivante :⁵⁴

$$I(t) = I_{\infty} [1 - \exp(-\pi^2 Dt / d^2)] \quad (\text{éq. 3.1})$$

Où, $I(t)$ est l'intensité de la bande sélectionnée pour suivre la molécule concernée en fonction du temps, t , I_{∞} est l'intensité de la bande choisie à temps infini, D la constante de diffusion et d l'épaisseur de la couche (donc l'épaisseur du biofilm).

Il est possible d'étudier certains facteurs susceptibles de restreindre, de ralentir ou d'accélérer une molécule qui pénètre un biofilm. Par exemple, la présence de polyssacharides enchevêtrés qui forment une matrice relativement dense restreint l'espace disponible à la molécule qui diffuse. On peut imaginer que son parcours est plus compliqué et ralenti à travers cette matrice. La grosseur des particules devrait donc être un facteur non négligeable dans la diffusion. D'ailleurs, une étude par spectrophotométrie a montré que le coefficient de diffusion dans un gel mixte de fibrose kystique et d'alginate produit par *Pseudomonas aeruginosa* était inversement proportionnel à la masse moléculaire de l'antibiotique⁵⁵ Deuxièmement, les polysaccharides et les bactéries sont chargés (généralement négativement).^{6,19} Il y a des interactions électrostatiques entre la biomasse et la molécule qui diffuse si elle est porteuse de charge. Ces interactions peuvent ralentir la diffusion. D'un autre côté, le caractère hydrophobe d'une molécule peut favoriser son insertion dans le biofilm ce qui influence sa diffusion. De plus, la molécule peut être métabolisée par les bactéries, ou encore, être détruite par des enzymes présentes dans le biofilm. Pour notre étude, nous supposons que les molécules diffusantes restent intactes au cours de leur diffusion.

Nous faisons l'étude de la diffusion de détergents dont les charges sont différentes et qui peuvent présenter des propriétés bactéricides. L'emphase est donc mise sur l'influence des interactions électrostatiques sur la diffusion dans

les biofilms bien que d'autres paramètres (telle que la taille des micelles) varient aussi entre les différents détergents.

III.1.4 Détergents et leur rôle dans le contrôle de bactéries

Les détergents (ou tensioactifs) sont des molécules amphiphiles que l'on peut schématiser comme suit :

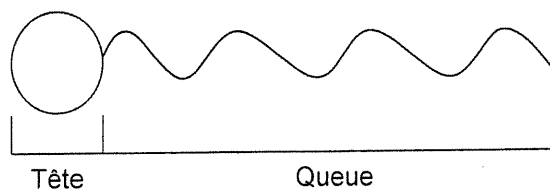


Figure III.1: Schématisation d'un tensioactif.

Où la tête est un groupement hydrophile tel qu'un groupement polaire ou ionique, et la queue, une (ou plusieurs) chaîne acyle hydrophobe. Les détergents forment des agrégats en milieu aqueux s'ils s'y trouvent en concentration suffisante. Un exemple d'agrégat est la micelle. La micelle est un regroupement de molécules où les parties hydrophobes sont réunies de manière à minimiser les interactions avec l'eau (**Figure III.2**). La concentration minimale pour qu'il y ait formation de micelle est nommée la concentration micellaire critique (CMC).

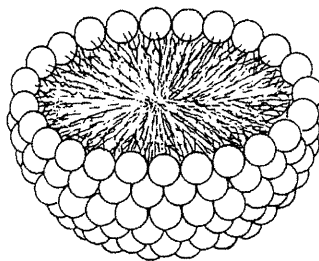


Figure III.2 : Vue en coupe transversale d'une micelle formée par les molécules amphiphiles en solution aqueuse.³

Des détergents sont utilisés à titre de bactéricide dans le contrôle de la plaque dentaire via les rince-bouche et les pâtes dentifrices.⁵⁶ Deux d'entre eux sont le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le chlorure de cétylpéridium (CPC) (**Figure III.3**). Il a été démontré que le SDS et le CPC pouvaient aider à contrôler la plaque dentaire dans le cadre d'un traitement de prébrossage.⁵⁶ Nous avons donc choisi de travailler avec ces deux détergents.

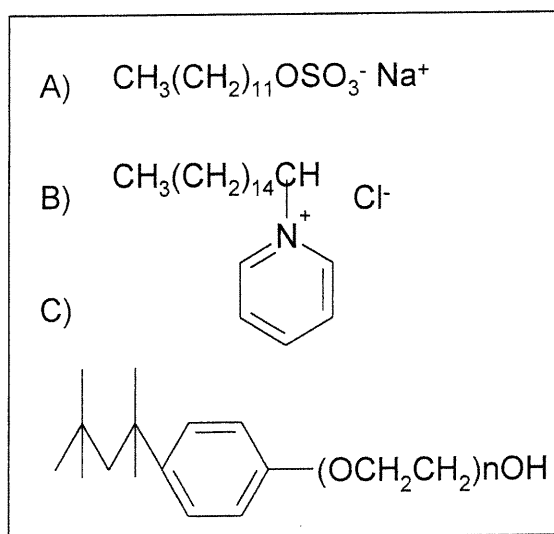


Figure III.3 : A) dodécylsulfates de sodium (SDS), B) chlorure de cétylpéridium (CPC) et C) Triton X-100.

Le SDS est un détergent chargé négativement, sa CMC est de 7.78 mM dans l'eau distillée.⁵⁷ Les micelles de SDS dans 0.1 M de NaBr présentent une forme de sphère aplatie de 30 Å par 23-24 Å. Le SDS a montré une capacité à dénaturer et solubiliser les protéines.⁵⁸ Le SDS est utilisé à 0.25% dans le Plax[®],⁵⁶ un rince-bouche, et a déjà été étudié sur un biofilm de *Streptococcus mutans* par Spectroscopie ATR-FTIR.⁵⁰ Il en ressort que le SDS s'accumule dans le biofilm, car l'intensité du signal attribué au SDS dans le biofilm dépasse son intensité en absence de biofilm, au terme de 100 minutes de diffusion. De plus, les auteurs concluent que le SDS attaque les protéines à la surface des bactéries, puisque l'intensité de bande IR attribuée aux protéines

diminue de 60 % à 80 % dans le spectre IR du biofilm.⁵⁰ Il est possible que le mécanisme d'action du SDS en tant que bactéricide soit relié à ses capacités à dénaturer les protéines hydrophobes.

Le CPC a une CMC de 1.12 mM dans l'eau distillée.⁵⁷ Sa tête hydrophile est formée d'un ammonium quaternaire avec, comme contre-ion, un ion chlorure. Les ammoniums quaternaires (comme dans le cas du CPC) ont montré une grande efficacité en tant que bactéricide.^{21,59,60} Le CPC est utilisé à 0.5% dans le rince-bouche Cépacol[®].⁶¹

Un autre détergent très connu est le Triton X-100 (**Figure III.3**). Bien qu'il ne soit pas utilisé dans le cadre de traitement de la plaque dentaire, nous l'avons sélectionné puisqu'il est neutre et que les deux autres tensioactifs étudiés sont chargés. Il est utilisé pour solubiliser des bicouches de lipides.⁶² Il possède une CMC de 0.23 mM dans l'eau distillée⁵⁷ et le diamètre de ses micelles dans l'eau à 35° C est de 54 nm.⁶³ Le Triton X-100 possède une tête polaire formée de fonctions éther.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1 Provenance des produits

Le chlorure de cétylpéridium ainsi que le dodécylsulfate de sodium proviennent de chez Sigma (St. Louis, MO 63178, USA) alors que le Triton-X provient de chez Fisher (Fair Lawn, NJ 07410, USA). Le milieu de culture utilisé est le TYE 0.5 % (p/v) de sucrose (décrit au chapitre II). La souche utilisée est le *Streptococcus mutans* NCTC 10 449 et provient de la réserve à -70° C du laboratoire du professeur Jean Barbeau de la Faculté de Médecine Dentaire de l'Université de Montréal.

III.2.2 Minibioréacteur

Les conditions de croissance en vue d'obtenir un biofilm de *Streptococcus mutans* ont été obtenues à partir d'une expérience où la même souche formait un biofilm à la surface de prothèses dentaires.⁶⁴ Dans un premier temps, pour valider la formation d'un biofilm, un minibioréacteur a été conçu et est représenté schématiquement à la **Figure III.4**. Une jarre de Coplin en polypropylène est percée à 3 cm du haut. Le couvercle est également percé en son centre. À chacune de ces deux ouvertures, un joint est installé pour y fixer des tubes qui permettent la circulation du milieu de culture dans la jarre à l'aide d'une pompe péristaltique. Un support de Téflon placé au fond de la jarre sert d'appuis à des lames de verre stériles et permet à un barreau aimanté d'agiter la solution en permanence. Le tout est stérilisé à 121° C avec 17 psi de pression pour 20 minutes. Une préculture est préparée à partir de 10 mL de milieu frais ensemencé de la culture bactérienne cultivée sur gélose sang et est incubée à 37° C pour 18 heures. En champ stérile, environ 15 mL de milieu de culture liquide stérile sont placés dans la jarre de Coplin et sont inoculés avec 6 mL de la préculture de bactéries. Le minibioréacteur est fermé de manière étanche sous agitation dans un incubateur à 37° C pour 5 heures. Ce laps de temps sert à faire adhérer les bactéries aux surfaces. Leduc et al.⁶⁴ utilisent une phase d'adhérence de six heures. Nos expériences ont montré que 5 heures d'adhérence suffisaient pour avoir la formation d'un biofilm. Ensuite, à l'aide d'une pompe péristaltique, du milieu de culture frais est acheminé à la jarre à un débit d'environ 0.5 mL/min. Le trop plein s'écoule par l'orifice sur le côté de la jarre et se déverse dans un contenant à déchets stérile. Les lamelles sont retirées à des temps différents pour juger de la croissance bactérienne à leur surface. Un test de coloration au cristal violet (qui teint les protéines et les sucres) indique l'importance de la croissance.

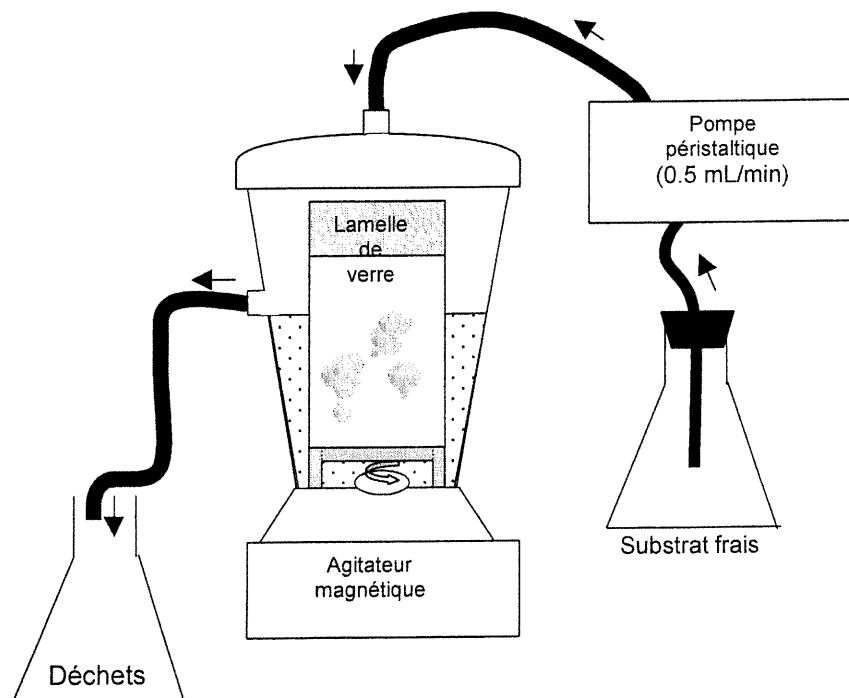


Figure III.4: Montage pour le minibioreacteur. Le substrat frais est acheminé dans le jarre par la pompe péristaltique à un débit de 0.5 mL/min. Les bactéries se reproduisent à la surface des lamelles de verre pour former un biofilm. La solution dans la jarre est agitée. Le trop plein se déverse par l'ouverture sur le côté du jarre dans un récipient à déchets. Le montage est maintenu à une température de 37° C.

III.2.3 Courbe de croissance du *Streptococcus mutans*

Comme il a été expliqué au chapitre I, la courbe de croissance nous permet de déterminer le temps de génération d'une bactérie dans un milieu de culture donné. Nous préparons des précultures qui servent à inoculer les cultures à partir desquelles la courbe de croissance est tracée. Deux précultures sont faites : une avec du TYE à 0.1% (p/v) sucrose et l'autre à 0.1% (p/v) glucose. Ces deux milieux de culture sont utilisés afin de comparer la viabilité des cellules bactériennes en présence des deux différents sucres et de s'assurer que les deux formes de préculture sont valables pour démarrer une croissance bactérienne. Les précultures sont inoculées avec la souche conservée sur gélose sang à 4° C, puis placées à croître à 37° C pour une période de 18 heures. Neuf tubes de cultures servent à tracer la courbe de croissance. Nous utilisons des tubes de verre pour Spectronic 20, munis d'un bouchon à vis, stérilisés à 121° C avec une pression de 17 psi pour 20 minutes. Les courbes de croissance sont effectuées avec du TYE enrichi de sucrose à 5% (p/v) et avec du TYE enrichie en glucose 0.5% (p/v). Cinq mL de milieu sont inoculés avec la préculture en glucose (250 µL) ou avec la préculture en sucrose (500 µL). Les expériences sont faites en duplicata. Un blanc est aussi fait en n'utilisant que le TYE 0.5% (p/v) sucrose.

Les neuf tubes sont maintenus à 37°C à l'aide d'un bain thermostaté. Les lectures de DO à $\lambda = 660$ nm sont faites avec un spectrophotomètre Sequoia-Turner 340 muni d'un filtre 420-890 nm. Les tubes sont agités mécaniquement avant chaque lecture. Les mesures sont prises à intervalles réguliers et portées en graphique sur une échelle logarithmique en fonction du temps. Le temps de génération est donné par le temps mis pour doubler la DO.

III.2.3 Montage IR et protocole expérimental

Le module ATR utilisé dans ce travail est le modèle Horizon de Harrick Scientific Corporation (Ossining, NY, É.U.) qui a été modifié pour nos besoins. La cellule à débit en acier inoxydable est montée avec un cristal ATR de séléniure de zinc en forme de prisme à face trapézoïdale avec des angles de 45° (**Figure III.5**). Deux éléments chauffants de 35 watts ont été introduits dans le couvercle de la cellule et sont connectés à un contrôleur de température fabriqué à l'atelier d'électronique du département de chimie de l'Université de Montréal. Celui-ci maintient la température à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ à partir d'une lecture de température prise par un thermocouple inséré dans la base de la cellule. L'extérieur de la cellule est isolé afin d'éviter des pertes de chaleur. Comme le montre la **Figure III.5**, une pompe péristaltique (Masterflex, model 0102) munie d'une tête de pompe (Masterflex, model 7013-20) assure un débit de 0.5 mL/min. Les tubulures sont en Tygon et les raccords et les pinces, en Téflon.

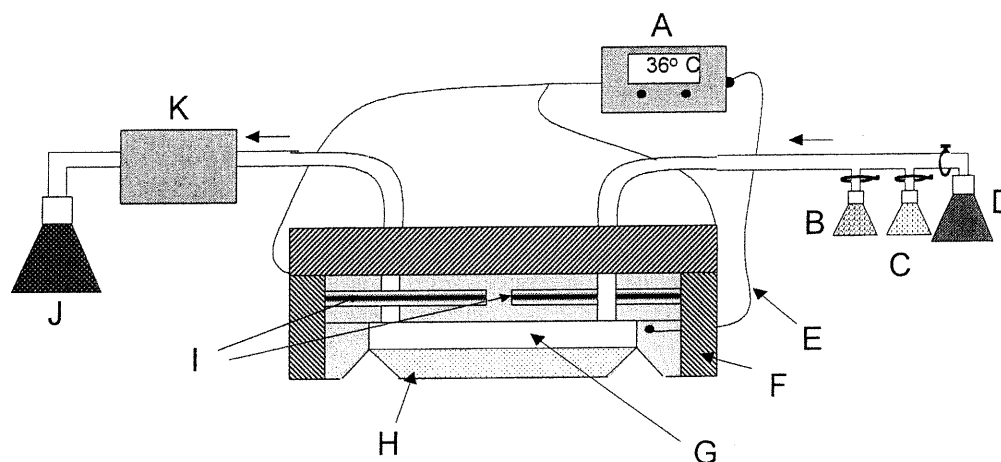


Figure III.5: Schéma du montage ATR. **A:** contrôleur de température, **B**, **C** et **D:** respectivement l'inoculum, la solution de diffusion et le substrat frais, **E:** thermocouple, **F:** mousse synthétique isolante, **G:** chambre de la cellule, **H:** cristal de séléniure de zinc, **I:** éléments chauffants, **J:** vase à déchets, **K:** pompe péristaltique.

La tubulure est stérilisée à 121° C et à une pression de 17 psi pour 20 minutes. Ensuite, la tubulure est raccordée à la cellule ATR en champ stérile. Nous faisons circuler de l'éthanol 70 % dans la cellule pour au moins deux heures, et la cellule est rincée en faisant passer de l'eau ultra pure stérile pendant environ une heure. Le chauffage à 36° C est amorcé pendant cette étape

Trois cents mL de milieu de culture stérile sont inoculés avec la souche conservée à 4° C sur gélose sang. La culture bactérienne croît à 37° C sous agitation pour 20 heures (ou jusqu'à ce que la densité optique à 660 nm de la culture liquide corresponde au début de la phase plateau dans la courbe de croissance). Cette culture est appelée inoculum et sert à ensemercer la cellule ATR avec la souche. Nous laissons sédimenter les agrégats de l'inoculum, puis le surnageant est mis en circulation dans la cellule ATR pendant 5 heures, tout de suite après le passage de l'eau stérile. Il est important de ne pas introduire d'agrégats dans la cellule, car ceux-ci se déposent sur le cristal et nuisent au développement d'un biofilm uniforme. Le substrat frais stérile circule dans la cellule pendant 15 heures. Pendant cette étape, le biofilm se forme à la surface du cristal. À chaque heure de la période d'inoculation et de la croissance du biofilm, un spectre IR est acquis en coadditionnant 3600 balayages (à raison d'environ une seconde par balayage) avec une résolution de 2 cm⁻¹. Le spectromètre FTIR utilisé est le même que celui décrit pour la méthode de quantification des sucres (chapitre II). De cette manière, la croissance du biofilm sur le cristal est suivie *in situ*.

Après les 15 heures de la phase de croissance du biofilm, le substrat stérile passant dans la cellule est remplacé par une solution contenant un détergent. Les solutions de détergents utilisées lors de ces expériences sont 10% (p/v) de SDS dans le TYE 0.5% sucrose (p/v), 2% (p/v) de CPC dans le TYE et 10% (v/v) de Triton X-100 dans le TYE 0.5 % sucrose (p/v). Dans le cas du CPC, la présence de sucrose dans le TYE provoque une précipitation et c'est pourquoi

il n'a pas été ajouté. Afin de minimiser le temps nécessaire pour que la concentration en détergent dans le volume libre de la cellule au dessus du biofilm atteigne celle de la solution, le débit de la pompe est augmenté à ~10 mL/min pour 20 secondes. Nous ramenons ensuite le débit à 0.5 mL/min. Des tests préalables réalisés avec la solution de SDS 10 % (p/v) dans le TYE et en absence de biofilm ont montré que 20 secondes suffisent à faire le changement du liquide dans le volume libre de la cellule. Il est aussi à noter que les variations de flots n'ont pas affecté le biofilm lors de nos contrôles. Aussitôt le débit ramené à 0.5 mL/min, des acquisitions spectrales sont faites à chaque 30 secondes (en coadditionnant 30 balayages) pour 20 minutes ou 40 minutes selon le détergent étudié. Ensuite, le substrat frais passe dans la cellule à nouveau, afin de laver le biofilm de la molécule diffusante. Pendant le lavage d'environ 4 heures, l'acquisition de spectres IR est faite à chaque heure.

Tous les spectres sont obtenus en utilisant comme spectre de référence un spectre de la cellule purgée au moins 5 minutes à l'azote. Chaque spectre est corrigé pour la dépendance de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente en fonction de la fréquence d_p (éq 1.2). La contribution de l'eau dans les spectres est aussi corrigée. Pour faire cette correction, un spectre d'eau enregistré à 36° C avec la cellule ATR est soustrait en utilisant la méthode de Dousseau et al.⁶⁵ Cette méthode consiste à éliminer la bande d'association de l'eau qui se trouve vers 2125 cm^{-1} (une région où il y a peu d'absorption du biofilm) à l'aide d'une méthode itérative de soustraction de manière à obtenir la meilleure ligne de base linéaire entre 2650 et 1750 cm^{-1} . Finalement, le spectre est décalé selon l'axe y en amenant l'absorbance à 1850 cm^{-1} à 0, car il n'y a pas d'absorption du biofilm à cet endroit du spectre.

À la fin d'une expérience IR, nous procédons à un dénombrement des bactéries qui se trouvent sur le cristal ainsi qu'à une évaluation de la cohésion du biofilm. Pour ce faire, la biomasse qui a poussé à la surface du cristal est

récoltée en champ stérile à l'aide d'un écouvillon stérile. À ce moment, la facilité avec laquelle le biofilm se détache du cristal nous permet d'évaluer la cohésion du biofilm de manière qualitative. Le biofilm est ensuite dispersé dans 2.5 mL de tampon PBS (décrit au chapitre II). L'écouvillon est laissé dans le tampon et, pour briser les agrégats, la solution est soumise à des ultrasons pour 4 minutes. Des contrôles faits sur une culture liquide de *Streptococcus mutans* dans le TYE 0.5% sucrose (p/v) cultivée à 37° C pour 18 heures, ont montré que le maximum de compte viable (UFC/mL) était observé pour une exposition de 4 minutes. Après le traitement aux ultrasons, nous faisons des dilutions desquelles 100 µL sont étalés sur une gélose TYE 0.5% sucrose. Les pétris sont placés à 37° C pour 48 heures pour permettre le dénombrement des colonies. Le nombre de colonie est ramené en UFC/cm² en estimant la surface du cristal à 3 cm².

Nous procédons aussi à un test de vitalité du biofilm par une coloration en fluorescence (*Backlight test* de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, É.U.)). Le test est effectué sur le biofilm selon le manuel d'instruction qui accompagne l'ensemble. Le biofilm est rincé délicatement à l'eau puis, il est observé à l'aide d'un microscope optique à fluorescence sous la lumière UV. Le test s'appuie sur la perméabilité de la membrane des bactéries à un fluorochrome.⁶⁶ Une fois à l'intérieur des bactéries, il se lie à l'ADN et donne une couleur aux bactéries. Si les bactéries sont vivantes, elles sont de couleur verte, alors que si elles sont mortes, on observe une couleur orange rouge.

III.3 Résultats et discussion

Le milieu de culture TYE dans lequel est ajouté 0.5% (p/v) de sucrose est connu pour favoriser la formation d'exopolysaccharides pour les streptocoques oraux.⁶⁴ Avec le minibioréacteur, nous avons vérifié la formation d'un biofilm

avec la souche *Streptococcus mutans* NCTC 10 449. Nous avons choisi de faire une phase d'inoculation de 5 heures, ce qui est similaire au temps déjà utilisé pour ce genre de culture.⁶⁴ Après cette période, nous examinons la croissance du biofilm. Après 10 heures de croissance, la lame de microscope présente une accumulation blanchâtre qu'il est possible de voir par simple inspection visuelle sur la majorité de la surface qui était submergée dans la culture. La teinture au cristal violet est faite sur un des cotés de la lame. L'inspection au microscope optique de ces agrégats révèle des bactéries (teintes en violet foncé) entourées d'une substance mauve à rose que nous supposons être la matrice d'exopolysaccharide dans laquelle se trouvent probablement des glycoprotéines. La quantité de bactéries à la surface de la lame est très importante (un film de quelques μm d'épaisseur) et celles-ci sont bien adhérentes à la surface du verre. Nous concluons donc à la formation d'un biofilm et utilisons ces conditions de croissance pour les expériences IR avec le montage ATR : i.e. une phase d'inoculation de 5 heures suivie d'une période de croissance d'un minimum de 10 heures à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ avec, comme milieu de culture, le TYE avec 0.5% (p/v) en sucrose.

Les courbes de croissance du *Streptococcus mutans*, obtenues à partir de la diffusion de la lumière à 660 nm, sont représentées à la **Figure III.6**. Pour l'ensemble des 8 cultures, la droite, qui correspond à la croissance exponentielle des bactéries, montre à peu près la même pente, et donc, le même temps de génération qui correspond à environ une heure trente. On voit que les cultures inoculées avec les précultures en sucrose et en glucose sont équivalentes. Il semble donc que les deux milieux soit adéquat pour une préculture. L'arrêt de la croissance, exprimé par le plateau après la phase de croissance, semble se faire plus tôt dans le cas des cultures en sucrose (s1a, s1b, s2a et s2b à la **Figure III.6**) par rapport aux cultures en glucose (g1a, g1b, g2a et g2b dans la **Figure III.6**). Comme il a été expliqué au chapitre I, ce ralentissement de la croissance peut être dû en partie à un manque de nutriments.⁴ Comme nous l'avons mentionné précédemment, les

glycosyltransférases produisent des polysaccharides structuraux en présence de sucres doubles.¹⁰ C'est peut être ce qui explique la courbe en sucrose, où une partie des sucres est polymérisée plutôt qu'utilisé pour la reproduction cellulaire. La culture représentée par s2b ne s'est pas développée et est donc rejetée dans la détermination du temps de génération.

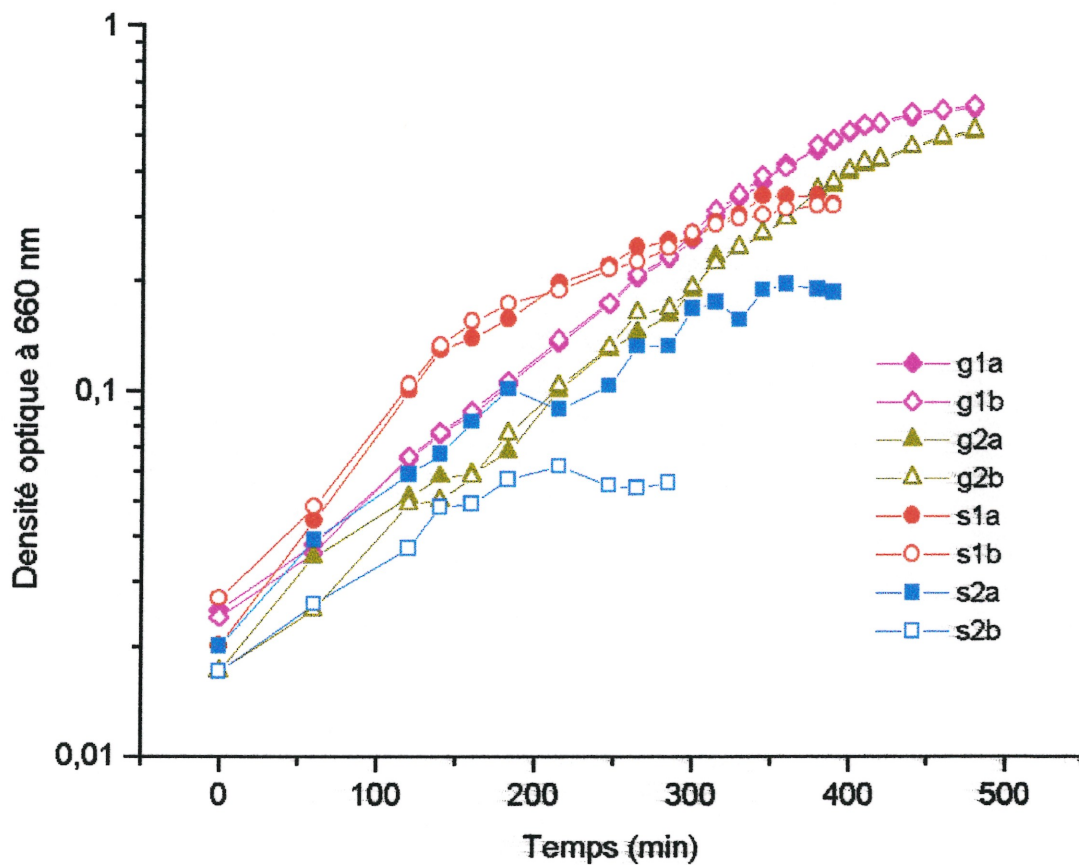


Figure III.6 : Courbes de croissance du *Streptococcus mutans* dans le TYE avec 0.5% (p/v) glucose (g dans la légende) et avec 0.5% (p/v) sucrose (s dans la légende). Les cultures ont été inoculées à partir de précultures de *Streptococcus mutans* en culture liquide TYE 0.1% (p/v) glucose (1 dans la légende) et 0.1% (p/v) sucrose (2 dans la légende). Les courbes ont été faites en duplicata (a et b dans la légende) en mesurant la densité optique à 660 nm.

La courbe de croissance est utilisée pour déterminer le temps de croissance nécessaire pour l'inoculum du montage ATR (300 mL de culture). Pour le premier inoculum effectué dans ce travail, nous avons déterminé que 20 heures de croissance étaient nécessaires pour atteindre une DO de 0.5 à 0.6. Cette DO correspond au début du plateau pour la courbe de croissance (**Figure III.6**). Au début du plateau, les bactéries sont suffisamment concentrées dans l'inoculum et encore physiologiquement homogènes.⁴ Pour les autres inoculums, nous nous fions au temps de croissance et à une estimation visuelle pour cesser la croissance de l'inoculum.

La méthode ATR nous permet de suivre l'évolution du biofilm *in situ*. Des bandes caractéristiques ont été attribuées pour différentes composantes du biofilm et sont indiquées à la **Figure III.7**. Les spectres présentés sont corrigés pour la contribution de l'eau dont la principale composante est la bande associée au mode de déformation vers 1645 cm^{-1} .⁶⁵ Cette correction pour l'eau affecte la bande Amide I (1600 cm^{-1}). L'estimation de la quantité de protéines dans le biofilm se fait donc à partir de la bande Amide II (1550 cm^{-1}). Tel qu'énoncé au chapitre II, la région entre 1270 et 1200 cm^{-1} montre des contributions importantes de l'ADN et permet donc de suivre l'évolution de la concentration de l'ADN lors de la croissance du biofilm. La région des vibrations C-O allant de 1200 à 950 cm^{-1} est principalement attribuée aux sucres étant donné la grande présence de fonction alcool dans ceux-ci⁴¹ bien que, tel que mentionné auparavant (voir section II.3.2), cette fenêtre spectrale inclut une contribution de l'ADN. La **Figure III.7** montre une augmentation de l'intensité des bandes de ces trois régions lors de la croissance du biofilm sur le cristal.

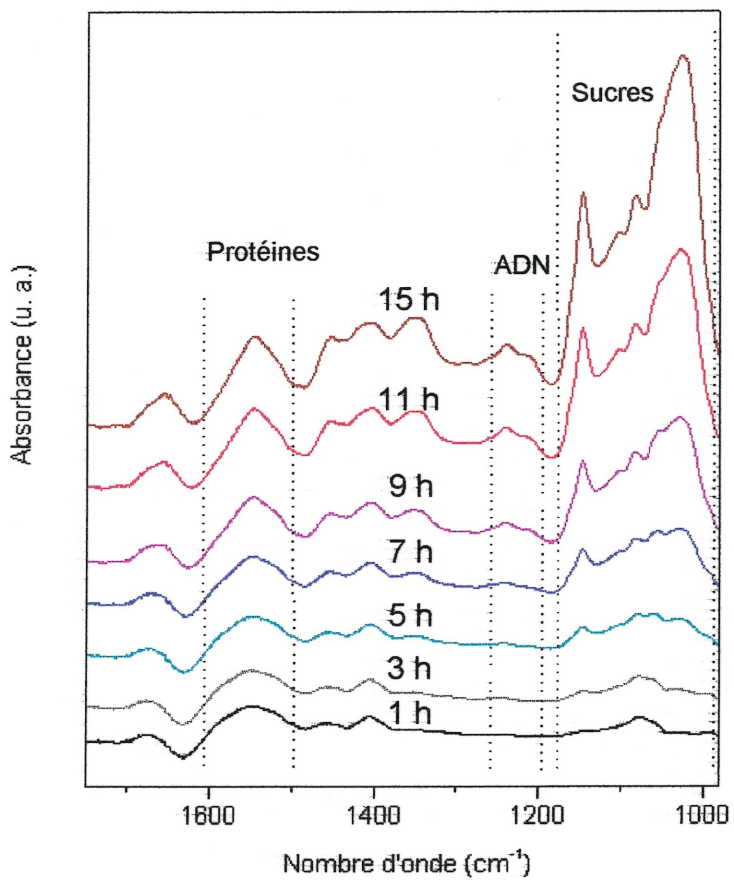


Figure III.7 : Évolution des spectres IR du biofilm qui croît sur le cristal ATR. La croissance en protéine est suivie par la bande Amide II (1600 à 1500 cm^{-1}). La bande des phosphates de 1270 à 1198 cm^{-1} permet de suivre l'évolution de l'ADN. La région de 1182 à 970 cm^{-1} est utilisée pour sonder les sucres.

La surface d'une bande peut être reliée à la quantité de produit qui est traversé par le faisceau IR tel que le décrit la loi de Beer (chapitre I). Nous faisons donc le suivi de la croissance du biofilm à la surface du cristal ATR en intégrant la surface des bandes caractéristiques aux protéines (de 1536 à 1478 cm^{-1}), à l'ADN (de 1270 à 1198 cm^{-1}) et aux sucres (de 1182 à 982 cm^{-1}). La surface pour les trois bandes caractéristiques est donnée en fonction du temps de croissance du biofilm à la **Figure III.8**. Les 5 premières heures correspondent à la phase d'inoculation du protocole de croissance. L'inoculum qui est utilisé pour cette étape d'adhérence possède une densité optique d'environ 0.5 à 0.6 à 660 nm, ce qui correspond au début du plateau sur la courbe de croissance (**Figure III.6**). Les bactéries qui colonisent la surface du cristal sont donc encore suffisamment physiologiquement semblables, mais le milieu de culture n'est plus aussi propice à la croissance des cellules. Il en ressort que le signal est pratiquement constant dans la phase d'inoculation (**Figure III.8**).

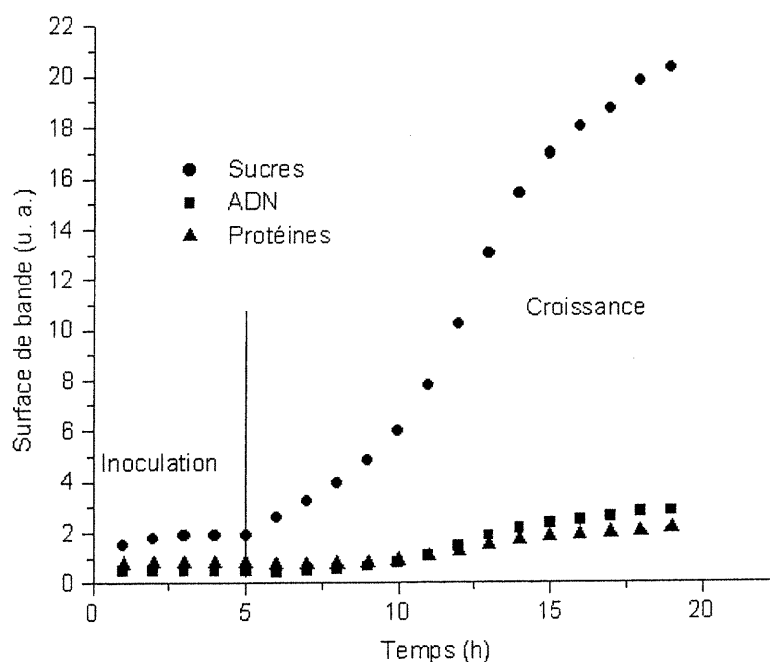


Figure III.8 : Évolution de la surface des bandes caractéristiques de l'ADN, des sucres et des protéines en fonction du temps de croissance.

De la cinquième à la vingtième heure, le milieu frais circule dans la cellule. Nous observons alors une augmentation de la surface de chacune des bandes de manière exponentielle, un peu comme dans le cas d'une courbe de croissance. Nous associons cette partie de la courbe à la croissance du biofilm sur la surface du cristal étant donné que l'augmentation des bandes correspond à une augmentation de produit détecté par l'onde évanescente du faisceau IR. Il faut souligner que les bandes n'ont pas toutes le même coefficient d'absorption et que les fenêtres d'intégration n'ont pas toutes la même largeur. Ceci implique que les valeurs absolues des surfaces de bandes n'apportent pas réellement d'information lorsqu'on les compare entre elles. La croissance de la bande reliée aux sucres peut paraître se faire plus rapidement que celles des protéines et de l'ADN, mais lorsque les trois courbes sont normalisées, elles montrent toutes le même profil. Ceci indique que la croissance pour toutes les composantes du biofilm se fait de manière simultanée et que chacune des bandes peut être utilisée pour suivre l'évolution de la biomasse sur le cristal. Si nous considérons seulement les premiers points de la phase de croissance (de 5 heures à 15 heures), il est possible de trouver un temps de génération en calculant le temps approximatif nécessaire pour qu'une bande double d'intensité (comme on le fait dans le cas de la DO). Nous trouvons un temps de génération de 3 heures en considérant la surface de la bande des sucres. Le temps de génération dans le biofilm de *Streptococcus mutans* serait donc plus long que celui observé en culture liquide. Ceci va dans le même sens que les observations du groupe de Costerton pour *Pseudomonas aeruginosa*.²⁰ La forme de la bande associée aux sucres change au cours de la croissance du biofilm (**Figure III.7**). Par exemple, le maximum dans cette fenêtre se situe à 1078 cm^{-1} durant les 5 premières heures de croissance. Subséquemment, le maximum est observé vers 1030 cm^{-1} . Il semble donc que la nature des sucres change durant la croissance du biofilm. Il est possible que le signal associé aux sucres lors des premières heures correspondent aux sucres qui se trouvent dans la forme

planctonique des bactéries, tandis que le signal observé après 7 heures soit associé à des sucres caractéristiques du biofilm.

À partir de la 15^e heure, le taux de croissance des trois bandes diminue et semble tendre vers un plateau. Il est possible que ce plateau corresponde à une diminution de la croissance bactérienne à la surface du cristal. Une autre possibilité serait la saturation de la région balayée par l'onde évanescente du faisceau IR (soit environ 4 μ m). Lorsque la croissance se fait au-delà de la profondeur d_p , les nouvelles molécules formant le biofilm ne sont pas détectées par le faisceau. Nous verrons plus loin que certains résultats appuient cette dernière explication. Aussi, la technique ATR a l'avantage de présenter toujours le même parcours optique.⁶⁷ Donc en comparant la bande d'association de l'eau à 2625 cm^{-1} du spectre de l'eau dans la cellule ATR avec la même bande d'eau dans le biofilm après les 20 heures de croissance, nous trouvons que le biofilm est composé à 98% d'eau dans la section balayée par l'onde évanescente. Il semble donc qu'il demeure beaucoup d'espace pour la croissance bactérienne dans la région balayée par le faisceau. Ceci peut expliquer qu'au terme de 20 heures de croissance dans la cellule, nous n'avons pas réellement atteint un plateau puisque la croissance demeure possible dans cette région du biofilm.

La croissance bactérienne dans la cellule ATR s'est montrée très reproductible si on se base sur les profils de croissance obtenus à partir des bandes pour l'ensemble des biofilms cultivés sur le cristal ATR. Aucun signal important n'est détecté pendant la phase d'inoculation, seulement 8 ± 5 % du signal maximum a été enregistré durant cette phase. Puis, une croissance importante est observable durant les 15 heures lorsqu'il y a circulation du substrat frais pour finalement tendre vers un plateau. Pour la surface de la bande des sucres, nous obtenons une valeur de 20 ± 2 unités arbitraires au terme de la croissance. Pour la bande de protéines, nous trouvons 1.7 ± 0.4 unités arbitraires et pour l'ADN, 2.3 ± 0.5 unités arbitraire.

Nous avons cultivé trois biofilms sur le cristal ATR pour lesquels la croissance a été arrêtée après 20 heures de croissance. Un dénombrement des bactéries viables par cm^2 a été effectué et a donné $2.5 (\pm 1.1) \times 10^8$ UFC/ cm^2 . En prenant le temps de génération des bactéries dans le biofilm, trouvé avec le profil de croissance sur le cristal ATR, il est possible d'évaluer la quantité de cellules viables qui avaient inoculées la surface du cristal au début de la croissance. Nous trouvons qu'il y avait 7.8×10^6 UFC/ cm^2 au temps zéro de la croissance. En assumant que ces bactéries sont toutes en contact avec le cristal et que la surface d'une bactérie est de $1\mu\text{m}^2$,⁵⁰ nous trouvons qu'environ 78 % de la surface du cristal serait colonisée. Lorsque la courbe de croissance atteint le plateau, si on suppose un empilement compact des bactéries (ce qui n'est pas le cas dans les biofilms) et que la croissance se fait de manière uniforme (ce qui n'est pas le cas non plus dans les biofilms), il existerait 25 couches de bactéries. À partir de ces hypothèses, il semble que le ralentissement de la croissance observé à la **Figure III.8** soit dû à une saturation de l'espace balayé par l'onde évanescente correspondant à l'accumulation de l'équivalent de 4 monocouches de bactéries. Par contre, comme il a déjà été proposé, l'espaces entre les bactéries reste considérable permettant la croissance dans cet espace.

À l'aide d'un microscope optique, nous avons évalué l'épaisseur d'un biofilm après 20 heures de croissance dans la cellule ATR (phase d'inoculation et de croissance). Tout d'abord, il faut mentionner que le biofilm de *Streptococcus mutans* qui se développe sur le cristal montre une structure qui ressemble beaucoup au modèle proposé par Costerton et al. pour un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.²⁰ Comme nous l'avons schématisé à la **Figure III.9 A**, le biofilm pousse en forme de colonnes (ou de champignons) ce qui crée des dénivellations importantes. Pour estimer l'épaisseur du biofilm, nous avons nettoyé le cristal avec un écouvillon au centre de la cellule de manière à dégager un bout du cristal ATR. Cet endroit nous a servi de référence dans les

mesures d'épaisseur du biofilm. Ensuite, nous avons pris 10 mesures d'épaisseur du biofilm de manière aléatoire. Les endroits les plus minces sont d'une épaisseur moyenne de $62 \pm 12 \mu\text{m}$ alors que les endroits les plus épais sont d'une épaisseur moyenne de $129 \pm 35 \mu\text{m}$. Par contre, si nous considérons le biofilm comme une couche mince uniforme, nous trouvons une épaisseur moyenne de $109 \pm 44 \mu\text{m}$. La **Figure III.9 B** montre une micrographie du biofilm déshydraté obtenue à l'aide d'un microscope optique. Bien que les colonnes se soient, en quelque sorte, effondrées, nous voyons clairement la morphologie non-uniforme du biofilm. Les régions plus foncées, donc plus denses, correspondent probablement à ces colonnes, tandis que les parties plus minces sont associées au tapis clair qui recouvre le cristal. L'observation du biofilm sec suggère que la croissance bactérienne couvre la quasi totalité du cristal.

Aussi, nous avons comparé le spectre IR du biofilm de *Streptococcus mutans* au spectre IR de la même souche après croissance sur gélose sang (**Figure III.10**). Les spectres sont normalisés par rapport à la hauteur de la bande Amide II (1550 cm^{-1}). Les spectres montrent des bandes dans les mêmes régions. La différence d'intensité au niveau de la bande Amide I (1600 cm^{-1}) vient très probablement de la correction de l'eau pour le biofilm. Une des différences majeures provient des bandes qui sont attribuables au lien C-O (1180 à 1000 cm^{-1}) et principalement attribuées aux sucres.⁴¹ Leur forme ainsi que l'intensité globale sont différentes. Il semble donc qu'il y a plus de sucres dans le biofilm que dans la colonie et que leur nature est différente. Il existe aussi une différence d'intensité au niveau des bandes reliées aux élongations C-H (3000 à 2850 cm^{-1}) qui sont plus intenses dans le cas du biofilm. Comme les sucres contribuent considérablement dans cette région, cette intensité accrue dans le spectre du biofilm supporte l'augmentation de la quantité de sucres proposée. Aussi, dans la région entre 1500 et 1300 cm^{-1} , on voit trois bandes à 1454 , 1402 et 1343 cm^{-1} dans le spectre du biofilm contre deux à 1454 et 1395 cm^{-1} dans le spectre de la colonie. Il semble qu'une nouvelle

substance soit synthétisée dans le biofilm. La bande à 1343 cm^{-1} peut provenir des nouveaux sucres dans le biofilm. À partir de ces deux spectres, nous concluons à une augmentation de la production de sucres par *Streptococcus mutans* dans sa forme biofilm relativement aux colonies poussées sur géluse.

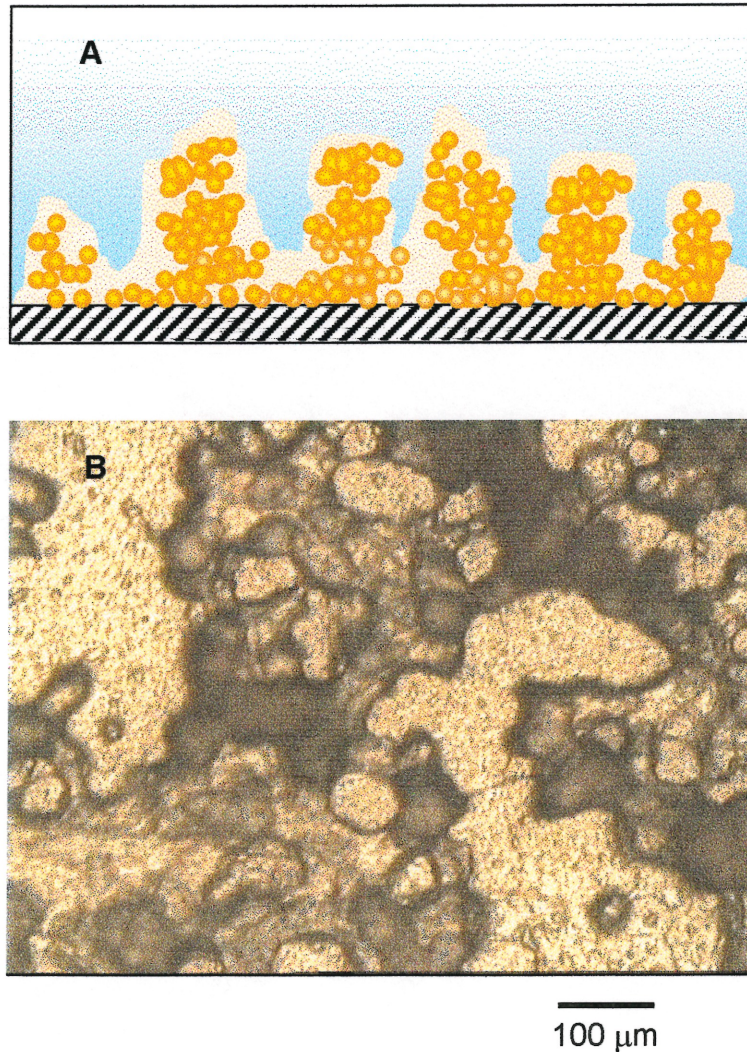


Figure III.9 : A) Schématisation d'une coupe du biofilm hydraté. Les sphères orange représentent les bactéries et le halo jaune, la matrice d'exopolysaccharides. B) Micrographie obtenue par microscope optique du biofilm sec sur le cristal ATR vu du dessus. Les endroits foncés représentent les endroits plus épais et seraient associés aux colonnes.

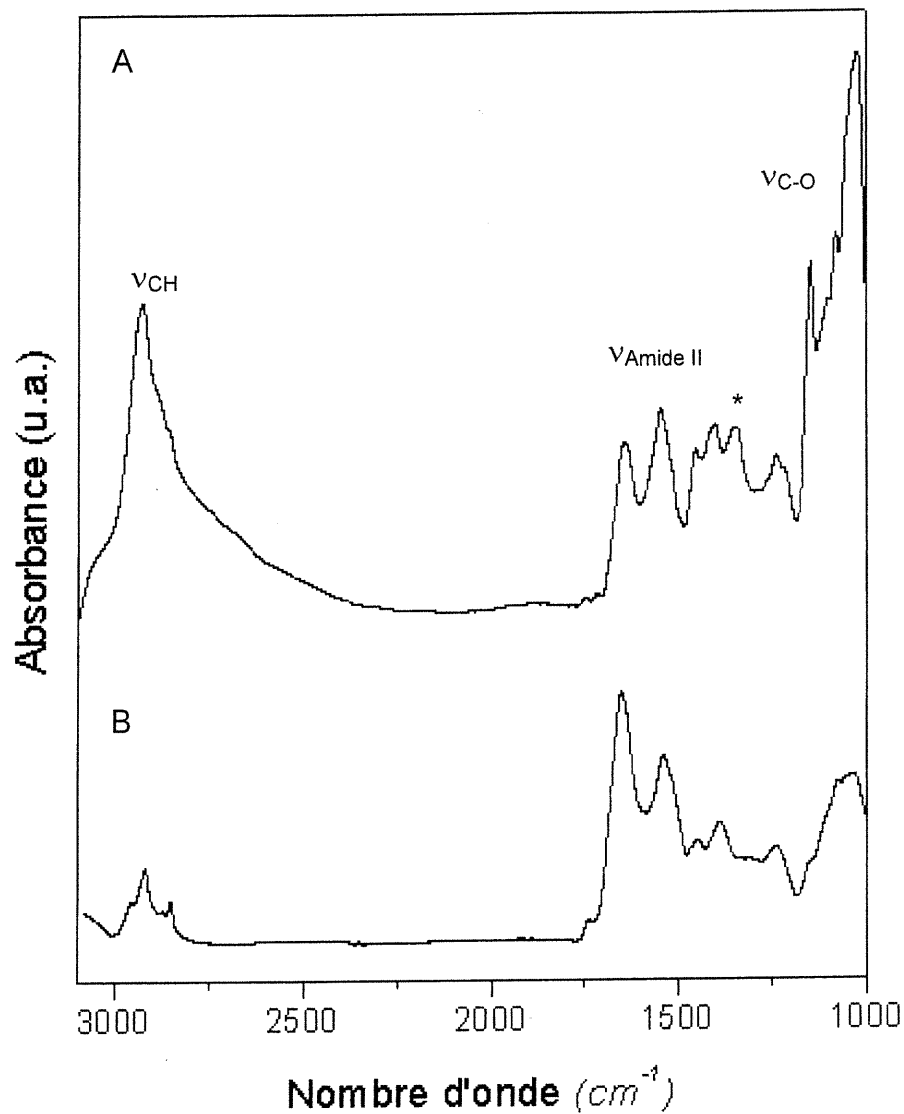


Figure III.10 : Comparaison de spectres de *Stretococcus mutans* sous forme de biofilm (A) vs une colonie poussée sur gélose sang (B). Les deux spectres sont normalisés par rapport à la bande Amide II. L'étoile indique la nouvelle bande à 1343 cm⁻¹ qui semble caractéristique du biofilm.

Lorsque le biofilm obtenu sur le cristal est reproductible et bien caractérisé, nous procédons aux études de diffusion de détergents. Les concentrations des tensioactifs ont été choisies de manière à être au-delà de la CMC. La concentration est environ 44 fois au-delà de la CMC dans l'eau pour le SDS, de 52 fois pour le CPC et de plus de 700 fois pour le Triton X-100. Il faut noter ici que la complexité du milieu de culture peut probablement faire varier la CMC par rapport à celle obtenue dans l'eau. Nous avons toutefois utilisé de grandes concentrations de manière à favoriser considérablement la formation de micelles. De plus, la spectroscopie IR est une méthode peu sensible et nécessite des concentrations élevées.

Pour suivre la pénétration des molécules dans le biofilm, une bande caractéristique pour chacun des produits est choisie. Cette bande est mise en évidence en soustrayant du spectre du biofilm enregistré pendant la diffusion le spectre du biofilm enregistré immédiatement avant la diffusion. Pour les trois détergents, nous retrouvons un spectre de différence qui est similaire au spectre de la molécule diffusante (**Figure III.11**) ce qui justifie notre approche. Pour déterminer le facteur de soustraction, nous nous basons sur le rapport d'intensité des bandes principales du spectre de la molécule diffusante. Une correction pour la ligne de base est effectuée, à cause de la ligne de base qui est en pente, à partir d'une droite brisée qui passe par 5 points dans le spectre où nous savons qu'il n'y a pas d'adsorption: à environ 3000, 2800, 1800 cm^{-1} , 950 cm^{-1} , et le cinquième point est différent selon le détergent. Nous choisissons un point à 1330 cm^{-1} pour le SDS, 1200 cm^{-1} pour le Triton X-100 et 1193 cm^{-1} pour le CPC. Puis nous décalons le spectre en y en amenant l'intensité à zéro à 1850 cm^{-1} . Cette approche, bien que subjective, s'est avérée reproductible. La bande caractéristique à chacun des produits a été identifiée par une flèche dans la **Figure III.11**.

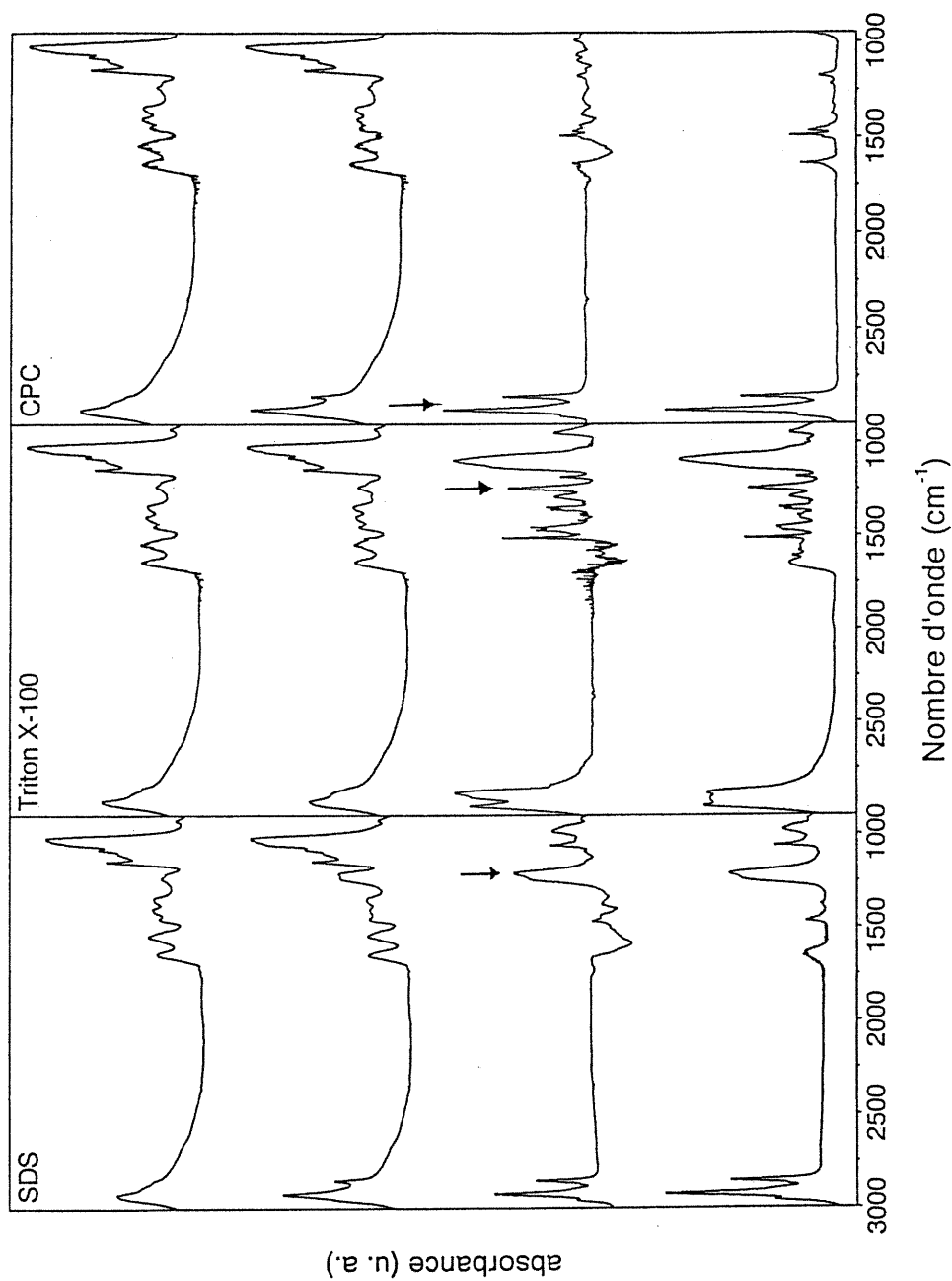


Figure III.11: Les spectres de la rangée du haut représentent le biofilm avant la diffusion et ceux de la deuxième rangée, les spectres du biofilm pendant la diffusion. Les spectres de la troisième rangée sont les spectres de différence du spectre du biofilm pendant la diffusion moins celui avant la diffusion. Finalement, les spectres de la dernière rangée sont ceux des produits diffusant. Les flèches indiquent les bandes qui ont été retenues pour suivre la diffusion des détergents.

Pour le SDS, la bande caractéristique choisie est un mode de vibration O-S-O du groupement sulfate que nous intégrons entre 1270 et 1198 cm^{-1} .²⁹ Elle est très intense et facilement observable dans les spectres de biofilm. Pour le Triton X-100, la bande à 1246 cm^{-1} , associée à une vibration de la fonction éther associée à un cycle aromatique,² a été retenue et est intégrée entre 1270 et 1210 cm^{-1} . Elle est toujours bien visible dans le spectre de soustraction et dans une fenêtre où il y a peu d'interférences avec les bandes principales du biofilm. Finalement, pour le CPC, les bandes reliées aux étirements des CH_2 et des CH_3 sont retenues (3000 à 2830 cm^{-1}), car elles sont les plus intenses du spectre du CPC. Elles sont aussi les plus faciles à identifier dans le spectre de soustraction à cause de leur faible largeur. La similitude du spectre de différence avec celui du CPC suggère que nous pouvons corriger raisonnablement malgré les nombreuses contributions du biofilm dans cette région.

La **Figure III.12** montre un exemple du profil de diffusion pour chacun des tensioactifs étudiés dans ce travail où les points sont les résultats expérimentaux et les traits rouges, la simulation mathématique tel que décrite plus loin. La diffusion s'effectue du surnageant au-dessus du biofilm vers le cristal. Dans ces conditions, à mesure que les molécules diffusantes se trouvent dans la section balayée par l'onde évanescente, l'intensité de la bande caractéristique augmente dans le spectre IR. L'augmentation de la surface de la bande est donc directement proportionnelle à l'augmentation de concentration de l'analyte à proximité du cristal.

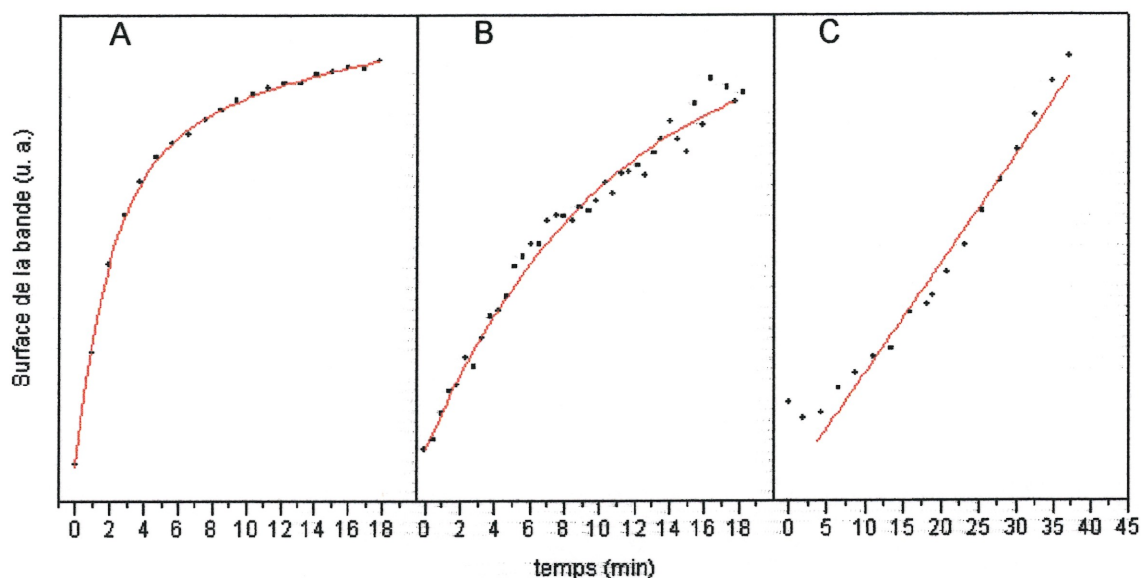


Figure III.12 : Exemple de profil de diffusion pour chacun des tensioactifs étudiés dans ce travail. A) SDS sur une période de 20 minutes, B) Triton X-100 sur une période de 20 minutes et C) CPC sur une période de 40 minutes.

Comme il a été mentionné précédemment, le montage ATR sonde seulement les 2 à 4 μm du biofilm à proximité du cristal. Le diamètre d'une bactérie étant d'environ 1 μm , l'information obtenue vient des deux ou quatre premières couches de bactéries. Donc, nous n'observons que la fin de course des molécules, i.e. lorsqu'elles sont très près du cristal. La **Figure III.12** montre clairement qu'il y a une différence entre les trois profils: En **A**, la diffusion est rapide, en **B**, la pénétration semble plus lente et en **C**, la diffusion est vraiment lente, même qu'après le double du temps d'observation, il n'y a toujours pas de commencement de plateau.

La différence majeure entre les trois types de micelle est leur charge: Soit négatif dans le cas du SDS, neutre dans le cas du Triton X-100 et positif dans le cas du CPC. Comme il a déjà été mentionné, les exopolysaccharides

(constituants majeurs de la matrice) sont porteurs de charges. Généralement, des charges négatives sont associées aux exopolysaccharides. Les bactéries aussi montrent un potentiel zéta qui est habituellement négatif. À la lumière des résultats de diffusion, il apparaît que plus la micelle est chargée négativement, plus sa diffusion est rapide dans le biofilm. Il semble donc que les molécules chargées positivement seraient ralenties dans leur course.

Si nous regardons plus en détail le profil de diffusion du SDS pour une période de diffusion de 20 minutes (**Figure III.12 A**), l'augmentation de sa concentration est d'abord très rapide, puis nous remarquons un ralentissement de l'augmentation du signal. Cette série de données est simulée par l'équation 3.2.

$$y = y_0 + A_1(1 - e^{-x/c_1}) + A_2(1 - e^{-x/c_2}) \quad (\text{éq. 3.2})$$

Celle-ci est de la même forme que l'équation 3.1 qui s'appuie sur la deuxième loi de Fick à l'exception qu'elle montre une double exponentielle. Le y_0 correspond à l'ordonnée à l'origine, les coefficients A_1 et A_2 représentent les contributions relatives des exponentielles caractérisées par les temps c_1 et c_2 et x est le temps. La simulation des courbes de diffusion a nécessité une fonction avec double exponentielle, la fonction monoexponentielle donnant des simulations clairement incorrectes. Les simulations pour la diffusion du SDS sur trois biofilms différents ont donné comme première constante $c_1 = 0.715 \pm 0.011$ min, et pour deuxième constante, $c_2 = 6.23 \pm 0.09$ min. Chacune des constantes est obtenue à partir de la moyenne pondérée des trois simulations de diffusion. Chaque exponentielle a une importance égale, les coefficients A_1 et A_2 étant du même ordre de grandeur.

Si nous supposons que le système est isotrope, il est possible de trouver les constantes de diffusion (D) associées à chacune des exponentielles de la

diffusion du SDS dans le biofilm de *Streptococcus mutans*, à partir de l'équation suivante:

$$D = \frac{d^2}{c\pi^2} \quad (\text{éq. 3.3})$$

Où d est l'épaisseur moyenne du biofilm ($109 \pm 44 \mu\text{m}$) et c le temps caractéristique des exponentielles. Les deux constantes de diffusion pour le SDS sont: $D_1 = 2.8 (\pm 2.2) \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $D_2 = 3.1 (\pm 2.5) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Les deux valeurs montrent une différence d'un facteur 10 et sont plus petites que la constante de diffusion du SDS dans l'eau obtenue par microscopie RMN ^1H de $1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.⁶⁸

Au terme des vingt minutes de diffusion, le signal semble plafonner. La valeur de la surface de la bande SDS correspond à $54 \pm 9\%$ de celle correspondant au spectre enregistré lorsqu'une solution de SDS de même concentration est circulée dans la cellule ATR en absence de biofilm.

Après l'expérience de diffusion, la cellule ATR est lavée pendant 3 heures avec du milieu frais. Après ce lavage, les bandes du SDS disparaissent du spectre ne laissant que très peu de signal dans le spectre de différence (**Figure III.13 A**). De plus, nous observons une diminution de la bande Amide II qui se traduit par une bande négative aux alentours de 1500 cm^{-1} . Ceci suggère que le SDS extrait certains protéines présentes dans la biomasse. D'ailleurs, Landa et al. ont fait la même observation et attribuent cette diminution de bande à la solvataion des protéines en surface des membranes de bactéries par le SDS.⁵⁰

Finalement, le passage de la solution de SDS dans le biofilm pendant une durée de 20 minutes affaiblit la cohésion du biofilm, car celui-ci devient beaucoup plus friable et il est beaucoup plus facile de récolter la biomasse à la surface du cristal (voir **Tableau III.1**). De plus, le test de viabilité a montré un biofilm

moins viable par rapport à un biofilm qui n'a pas été en contact avec le SDS. Ceci est confirmé par le compte nul de UFC/cm² après le passage du SDS. Ceci corrobore avec une expérience faite avec le Triclosan à 3% (une autre molécule utilisé dans un rince-bouche) dans une culture de plaque dentaire. Le passage de cette solution a montré une diminution des bandes Amide I et II dans une expérience par ATR.⁶⁹

Les deux modes de diffusion peuvent être interprétés de plusieurs façons. Une première hypothèse peut être attribuable à la physiologie du biofilm. La diffusion la plus rapide pourrait être due à la pénétration des micelles de SDS dans les endroits les plus minces du biofilm. Le deuxième mécanisme pourrait être alors dû à la pénétration du SDS dans les régions protégées par les colonnes. Si le matériel est plus dense au niveau des colonnes, il est possible que la constante de diffusion soit plus lente. Costerton et al. suggèrent qu'il y a des endroits plus denses en polysaccharides dans le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.¹¹

Tableau III.1 : Bilan des tests de cohésion, de viabilité et de compte viable sur le biofilm après la diffusion des détergents.

Produit de diffusion	Cohésion du Biofilm	Viabilité du Biofilm	UFC/cm ²
Aucun	++	++	2.5 (± 1.1) x 10 ⁸
SDS	--	+	0
Triton X-100	+	++	1.5 (± 1.0) x 10 ¹⁰
CPC	-	+	0

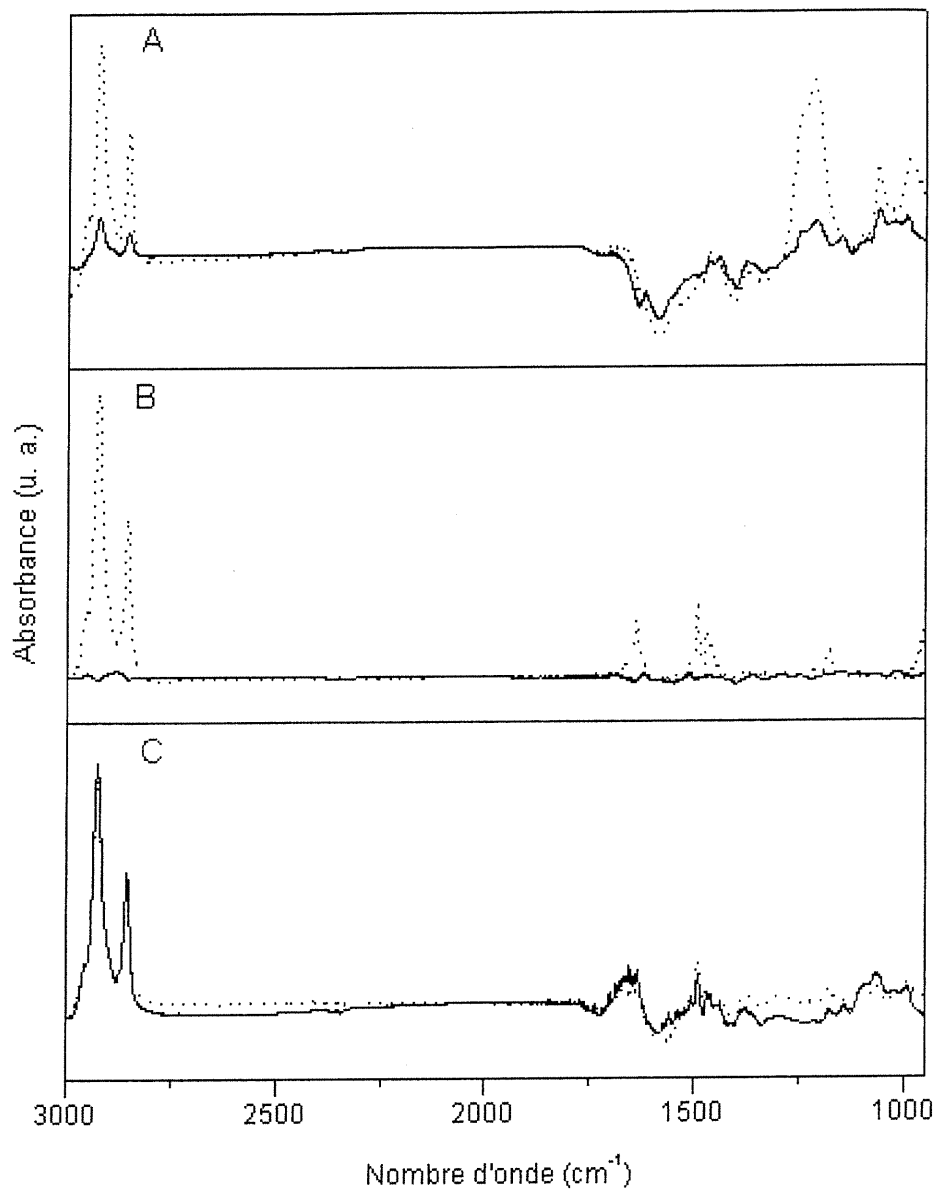


Figure III.13 : Spectres de différence du spectre du biofilm après le lavage moins le spectre du même biofilm avant la diffusion (—). Spectre de différence du spectre pendant la diffusion (...) (pris de la figure III.11 3^e rangée). A) SDS, B) Triton X-100 et C) CPC.

Aussi, une plus grande densité de biomasse au niveau des colonnes impliquerait aussi des charges négatives plus abondantes¹¹ à cause des exopolysaccharides et des membranes de bactéries; et la répulsion électrostatique entre le biofilm et les micelles de SDS pourrait ralentir d'avantage la diffusion. Des dextrans polyanioniques ont été utilisés pour montrer une variabilité de densité de charges dans un biofilm mixte à l'aide de la microscopie confocale à balayage.¹¹ Cette deuxième étape de diffusion (diffusion des régions minces du biofilm aux régions associées aux bases des colonnes) serait dépendant de la concentration du SDS dans les régions autour des colonnes. Dans ce cas, le modèle mathématique serait différent de celui que nous utilisons même si la constante de diffusion était la même partout dans le biofilm.

Le signal associé au SDS atteint un maximum de 54 ± 9 % dans le biofilm par rapport à celui observé pour une solution de SDS de même concentration en absence de biofilm. Ceci vient à l'encontre des résultats obtenus par Landa et al.⁵⁰ qui observent une accumulation du SDS dans le biofilm. Cette différence vient probablement du temps de diffusion qui est différent de plusieurs minutes. En assumant que le biofilm est homogène, à partir des $2.5 (\pm 1.1) \times 10^8$ UFC/cm² qui sont trouvées à la fin de la croissance du biofilm et de l'épaisseur moyenne du biofilm de 109 ± 44 µm, nous avons trouvé que 29% de l'espace sont occupés par les bactéries si on assume que le diamètre des bactéries est de 1µm.⁴ Le signal maximal de 54 ± 9 % de SDS suggère que le SDS occupe l'espace resté libre dans le biofilm et qu'il ne pénètre pas à l'intérieur des bactéries. Cependant, nos résultats indiquent aussi que le SDS extrait des protéines du biofilm.

Une autre explication pour les deux coefficients de diffusion observés serait que le SDS diffuse sous deux formes dans la matrice. Le SDS est reconnu pour sa capacité à solubiliser les protéines hydrophobes.⁵⁸ Il est donc possible que le SDS fasse un complexe avec les protéines qu'il aurait extraites des

membranes bactériennes. La diminution de la bande Amide II montre une diminution de la quantité de protéines dans le biofilm. Landa et al. observent eux aussi une diminution des bandes Amide et associent cette diminution à une perte des protéines en surface des membranes bactériennes.⁵⁰ Nous avons tenté de varier la concentration de SDS dans la solution de diffusion. Une concentration plus faible a montré seulement le temps caractéristique long. On peut donc penser que le temps court serait relié à l'excès de SDS nécessaire pour extraire les protéines, et donc attribuable à la diffusion du SDS seul sous forme de micelle. Malheureusement, l'utilisation de concentration plus élevée a été impossible, car elle menait à une dispersion trouble. Une autre explication possible serait l'existence de SDS sous forme de micelle et de monomère. Nous n'avons pas pu déterminer la CMC du SDS dans le TYE. Par contre, les résultats avec la solution de SDS moins concentrée ne vont pas dans le sens de cette hypothèse.

Le profil de diffusion du Triton X-100 dans le biofilm semble suivre une seule exponentielle (**Figure III.12 B**) bien que le plateau ne soit pas complètement atteint. Il aurait été préférable de poursuivre les expériences jusqu'à obtention d'un plateau. Les simulations ont été effectuées à partir de l'équation 3.2 où le coefficient A_2 est égal à zéro. Les simulations donnent une constante c de 9.4 ± 0.6 min qui est la moyenne pondérée pour les trois expériences indépendantes. Dans le biofilm, nous obtenons une constante de diffusion de $2.2 (\pm 1.7) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, alors que la constante de diffusion du Triton X-100 dans l'eau est de $5.569 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.⁶⁸ Il n'est pas impossible de simuler le profil de diffusion du Triton X-100 avec une double exponentielle. Les paramètres obtenus ne sont pas reproductibles, et dans certains cas, l'algorithme élimine lui-même la seconde exponentielle. Par contre, ceci vient peut être du fait que le plateau n'était pas tout à fait atteint. Au terme des 20 minutes de diffusion, 20 ± 9 % du signal du Triton X-100 est détecté par rapport à celui mesuré pour une solution de même concentration en absence de biofilm. Aussi, nous ne retrouvons plus de Triton X-100 dans le biofilm

après le lavage de la cellule ATR par le milieu frais (**Figure III.13 B**) Les tests de post-diffusion ne montrent aucun changement dans la viabilité du biofilm (**Tableau III.1**). De plus, la cohésion du biofilm est comparable à celle d'un biofilm non traité. Finalement, le dénombrement de bactéries à la surface du biofilm après le passage du Triton X-100 est de $1.5 (\pm 1.0) \times 10^{10}$ UFC/cm², soit 100 fois plus qu'au bout des 20 heures de croissance. Ceci veut dire que non seulement le Triton X-100 ne semble pas affecté le biofilm, mais que la croissance bactérienne continue durant la diffusion de celui-ci.

Une première hypothèse pour expliquer que l'on voit un seul mode de diffusion serait que le Triton X-100 est neutre. En assumant que les régions du biofilm sont plus denses, la différence de coefficient de diffusion entre les régions plus denses et celles moins denses serait moins importante que dans le cas du SDS étant donné que le Triton X-100 ne subirait pas les interactions électrostatiques répulsives avec les composantes chargées du biofilm. Par contre, il semblerait que seul 20 ± 9 % de l'eau présente dans le biofilm soit disponible au Triton X-100. Comme il a été dit plus haut, le biofilm est composé à 98% d'eau avant la diffusion. Une partie de cette eau est comprise dans les bactéries et d'autres sections sont peut-être peu accessibles aux micelles dû à l'enchevêtrement des expolysaccharides. Dans le cas du SDS, comme il diminue la cohésion du biofilm, une altération de la matrice permet peut-être une plus grande pénétration dans le biofilm.

L'absence de 2 exponentielles pourrait aussi être attribuable à la grande dispersion dans les points décrivant le profil de diffusion qui rend plus difficile la simulation d'une double exponentielle. Cette dispersion provient principalement de la plus grande difficulté à isoler la bande utilisée pour quantifier le Triton X-100. Aussi, comme il a déjà été dit, peut être que l'observation sur un plus long temps aurait montré la deuxième exponentielle.

Le coefficient de diffusion légèrement plus grand pour le Triton X-100 que celui observé pour le SDS est compatible avec le fait que la micelle de Triton X-100 est près de deux fois plus grosse que celle du SDS si l'on se réfère à la littérature.^{58,63}

Comparé au deux autres détergents, le CPC montre un profil de diffusion différent dans les biofilms de *Streptococcus mutans* (**Figure III.12 c**). Malgré que le temps de diffusion soit doublé, il est impossible d'observer un plateau qui nous indiquerait que nous avons atteint une concentration de CPC maximale dans le biofilm, même lorsque la diffusion est faite pendant près d'une heure. Nous avons déjà expliqué que la surface de la bande est proportionnelle à la concentration du produit détecté par le faisceau IR. Or, pour les premières 5 minutes, il ne semble pas y avoir de signal caractéristique du CPC, puis il y a une augmentation linéaire de sa concentration. La surface de la bande caractéristique du CPC dans le biofilm demeure toujours plus petite que celle du spectre d'une solution de CPC de même concentration en absence de biofilm. Après 40 minutes de diffusion, nous retrouvons $35 \pm 6 \%$ du signal du CPC par rapport à une solution de CPC de même concentration. Suite au lavage de la cellule par le substrat frais, seulement 27% du CPC quitte le biofilm (**Figure III.13 C**). Les tests de post-diffusion montrent une diminution de la viabilité du biofilm et une inhibition de la reproduction des cellules bactériennes (i.e. un dénombrement de bactéries nul). La cohésion du biofilm est aussi beaucoup moins grande après le contact avec le CPC (**Tableau III.1**).

Deux phénomènes peuvent expliquer que nous n'atteignons pas de plateau en 40 minutes: soit la diffusion est très lente, soit il y a une accumulation de détergent dans le biofilm. La présence du CPC dans le biofilm après le lavage et les observations post-diffusion laissent croire à une interaction du CPC avec les bactéries. Cette interaction est probablement due à la charge positive des micelles de CPC avec les bactéries qui possèdent un potentiel zéta négatif ou

les polysaccharides qui sont généralement porteurs de charges négatives. Les interactions ralentissent la progression du CPC dans le biofilm, telle qu'illustrée par la lente augmentation du signal. De plus, l'absence de signal en début de diffusion suggère aussi une diffusion lente du CPC dans le biofilm. Par contre, si nous supposons que le Triton X-100 n'interfère pas avec le biofilm, les résultats du Triton X-100 suggèrent alors que seulement 20 ± 9 % de l'espace est disponible aux micelles dans le biofilm intacte. Nous trouvons que 35 ± 6 % de CPC se trouve dans le biofilm après 40 minutes de diffusion. Nous avons remarqué que la cohésion du biofilm est affectée par le passage du CPC, et donc, il se peut que des ouvertures dans la matrice permettent une meilleure pénétration du CPC dans le biofilm. Le CPC est connu pour former des complexes avec les glycosaminoglycans (une forme de polysaccharide).⁷⁰ Comme l'intensité du CPC n'atteint pas de maximum et que le CPC demeure à 73% dans le biofilm après la lavage, il est possible qu'il y ait une accumulation de CPC dans le biofilm.

III.4 Conclusion

Au cours de notre étude sur les biofilms par spectroscopie IR, nous avons déterminé les conditions de croissance pour le *Streptococcus mutans* pour qu'il y ait formation d'un biofilm à la surface du cristal ATR. Un protocole de croissance a été mis au point de manière à obtenir un biofilm reproductible d'une expérience à l'autre. Nous avons trouvé en moyenne $2.5 (\pm 1.1) \times 10^8$ UFC/cm² dans le biofilm au terme d'une croissance de 20 heures.

Nous mettons en parallèle la diffusion de trois détergents pour lesquels nous avons observé des courbes différentes. Bien que des expériences de diffusion ont déjà été faites pour des petites molécules, des antibiotiques et même pour le SDS, la comparaison entre les profils de diffusion pour le SDS, le Triton X-

100 et le CPC apporte de l'information nouvelle sur les facteurs qui influencent la diffusion dans le biofilm.

La progression des micelles de SDS dans le biofilm est caractérisée par deux constantes de diffusion : $D_1 = 2.8 (\pm 2.2) \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $D_2 = 3.1 (\pm 2.5) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Ceci peut être dû à la physiologie du biofilm où la diffusion serait plus rapide dans les sections minces par rapport à celle dans les colonnes. Ou encore, le coefficient le plus lent serait attribuable aux interactions du SDS avec les protéines dans le biofilm ce qui est en accord avec la diminution de la bande Amide II après le passage du SDS dans le biofilm. Aussi, le SDS inhibe la reproduction des cellules et diminue la viabilité du biofilm. Après le passage du SDS, le biofilm est beaucoup plus fragile par rapport à un biofilm non traité.

Le Triton X-100 semble présenter un seul mode de diffusion et nous avons trouvé une constante de diffusion de $2.2 (\pm 1.7) \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Si nous supposons qu'il y a des régions denses en charges dans le biofilm, comme le Triton X-100 est neutre, il subirait peu d'interactions électrostatiques. Le Triton X-100 ne semble pas interagir avec les bactéries, ni affecter leur viabilité ou leur reproduction.

Les expériences de diffusion avec le CPC suggèrent qu'il y a une interaction forte entre la molécule et le biofilm qui conduit à la diffusion lente des micelles à l'intérieur du biofilm et probablement à une accumulation du CPC dans le biofilm. Cette interaction vient probablement des interactions électrostatiques entre les charges négatives abondantes dans le biofilm et de la charge positive de l'ammonium quaternaire du CPC. De plus, le contact des bactéries avec le CPC semble affecter leur reproduction et la viabilité du biofilm ainsi que diminuer la cohésion de la biomasse.

Les biofilms de *Streptococcus mutans* ont été affectés par le SDS et le CPC même si dans un cas la diffusion était rapide et que dans l'autre la diffusion était plus lente. Donc, selon nos résultats, la diffusion ne semble pas intervenir dans le caractère bactéricide des détergents choisis. Par contre, seuls les détergents chargés ont modifié la viabilité du biofilm.

Chapitre IV

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons exploité la spectroscopie IR pour développer une nouvelle méthode qui permet d'estimer la production de sucres chez différentes souches bactériennes. Cette méthode de quantification des sucres nous a permis, entre autre, de montrer l'importance de la matrice de polysaccharides dans le biofilm de *Streptococcus mutans* par rapport à sa croissance sous forme planctonique ou sur milieu solide. Nous avons aussi examiné, par spectroscopie IR, la diffusion de trois tensioactifs (le SDS, le CPC et le Triton X-100) dans le biofilm de *Streptococcus mutans*. L'analyse des résultats semblent indiquer que la charge des détergents influence leur diffusion dans le biofilm, mais aucune corrélation entre la facilité de diffusion et le pouvoir bactéricide n'a été établie.

À partir de l'approche spectroscopique utilisée, il est impossible d'établir l'origine des interactions électrostatiques qui influencent la diffusion. Nous ne sommes pas en mesure de déterminer si elles impliquent les bactéries et/ou les exopolysaccharides, ni de savoir leur ordre de grandeur. Cette information est pourtant essentielle. L'interaction avec les bactéries pourrait constituer une nouvelle approche pour améliorer la vectorisation d'antibiotiques dans le biofilm. Si l'interaction se fait avec les sucres, il est possible que les forces électrostatiques ralentissent les molécules et nuisent à leur effet bactéricide. Des études en microcalorimétrie pourraient nous fournir des détails quant à ces interactions et jeter une lumière sur les sites de liaison des détergents.

Il a été proposé que des antibiotiques encapsulés dans des liposomes seraient plus efficaces que la forme libre (dégagée).^{71,72} Une des raisons proposées est une meilleure diffusion de la forme encapsulée dans le biofilm. La méthode mise au point dans ce travail permettrait de comparer la diffusion des deux

formes de l'antibiotique. Nos expériences ont montré l'efficacité de ce système et sa bonne reproductibilité.

Nous avons déjà mentionné qu'il existait plusieurs facteurs limitant dans le processus de diffusion. La taille est un facteur de limitation de la diffusion qui est non négligeable. Dans ce travail nous avons porté notre attention sur les charge, par contre, il serait intéressant de faire le même genre d'expérience, mais où la taille des particules serait mis en comparaison. Par exemple, il serait possible de faire diffuser des solutions de polymère soluble dans l'eau, comme le polyéthylèneglycol, dont la masse molaire moyenne est différentes pour chacune des expériences.

La méthode de quantification des sucres a mis en évidence une plus grande quantité de sucres dans le biofilm de *Streptococcus mutans* par rapport à sa colonie isolée sur une gélose sang. Il serait intéressant d'étendre la méthode de quantification des sucres à diverses formes de biofilms et de vérifier si l'enrichissement en sucres, par rapport à la forme planctonique d'une souche, est caractéristique aux biofilms.

Finalement, il serait intéressant de vérifier l'application de la méthode à d'autres types d'échantillons. Par exemple, la méthode pourrait s'avérer compatible à la détermination des sucres chez les amibes et les levures.

Références

1. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 350.
2. D. C. Harris and M. D. Bertulocci, *Symmetry and Spectroscopy, An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Dover Publication, inc., New York, 1978.
3. J. A. Darnell, H. F. Lodish and D. Baltimore, *Biologie Moléculaire De La Cellule, 2e Édition*, De Boek Université, Bruxelles, 1993.
4. M. J. jr. Pelczar, R. D. Reid and E. C. S. Chan, *Microbiology, Fourth Edition*, McGraw-Hill Book Compagny, New York, 1977.
5. K. Arms and P. S. Camp, *Biologie Tome I*, Éditions Études Vivantes, Laval, 1989.
6. T. Saito, T. Takasuka, T. Kato, K. Ishihara and K. Okuda, *Arch. Oral Biol.*, 1997, **42**, 539.
7. R. Oelerich, *The Bacteria Cell wall* [Page Web], 1996, disponible à http://minquest.net/biology/microbiology/outlines/u_cwall.html, dernière visite: 2000.
8. H. N. Newman and M. Wilson, *Dental Plaque Revisited Oral Biofilms in Healt and Desease*, Bioline, London, 1999.
9. S. Wenyuan, *The Role of Pili in Cell Movement and their Possible Role in Spatial Positioning Within Biofilms*, Biofilms 2000, Big Sky, Montana, USA, 19 July, 2000, Americain Society for Microbiology.
10. R. J. Nisengard and M. G. Newman, *Oral Microbiology and Immunology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.

11. J. W. Costerton, Z. Lewandoski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber and G. James, *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, 2137.
12. G. D. Christensen, L. M. Baddour and W. A. Simpson, *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 2870.
13. G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton and E. H. Beachey, *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **22**, 996.
14. R. Baselga, I. Albizu, M. De la Cruz, E. Del Cacho, M. Barberan and B. Amorena, *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 4857.
15. J. Barbeau, L. T. Boken, C. Gauthier and A. P. Prévost, *Journal of Hospital Infection*, 1998, **40**, 303.
16. J. Barbeau, C. Gauthier and P. Payment, *Can. J. Microbiol.*, 1998, **44**, 1019.
17. H. C. Van Der Mei, J. Noordmans and H. J. Busscher, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **991**, 395.
18. S. Kawabata and S. Hamada, *Methods Enzymol.*, 1999, **310**, 513.
19. A. Percot, *Les exopolysaccharides microbiens: Propriétés, potentialités pratiques et productions par cultures immobilisées.*, 1995, p. Université de Rouen.
20. J. W. Costerton, P. S. Stewart and E. P. Greenberg, *Science*, 1999, **284**, 1318.
21. A. D. Russell, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, **52**, 227.
22. D. G. Davies, R. M., Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg, *Science*, 1998, **280**, 295.

23. D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn and D. Naumann, *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**, 69.
24. G. D. Sockalingum, W. Bouhedja, P. Pina, P. Allouch, C. Bloy and M. Manfait, *Cell. Mol. Biol.*, 1998, **44**, 261.
25. D. Naumann, D. Helm and H. Labischinski, *Nature*, 1991, **351**, 81.
26. P. J. Bremer and G. G. Geesey, *Biofouling*, 1991, **3**, 89.
27. D. E. Nivens, J. Schmit, J. Sniatecki, T. R. Anderson, J. Q. Chambers and D. C. White, *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47**, 668.
28. P. A. Suci, M. W. Mittelman, F. P. Yu and G. G. Geesey, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 2125.
29. R. M. Silverstein, G. C. Bassler and T. C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Fifth Edition*, John Willey & Son, inc. New York, 1991.
30. S. YU. Venyaminov and N. N. Kalnin, *Biopolymers*, 1990, **30**, 1259.
31. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J.-M. Ruyschaert, *Subcell Biochem*, 1994, **23**, 329.
32. N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*, Harrick Scientific Corporation, Ossining, 1979.
33. K. A. C. C. Taylor, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1995, **53**, 207.
34. N. O. Bianchi, C. Redi, C. Garagna, Capanna E. and M. G. Manfredi-Romanini, *J. Mol. Evol.*, 1983, **19**, 362.
35. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248.
36. A. H. Reisner, P. Nemes and C. Bucholtz, *Anal. Biochem.*, 1975, **64**, 509.

37. J. J. Sedmak and S. E. Grossberg, *Anal. Biochem.*, 1977, **79**, 544.
38. H. J. Luinge, E. Hop and E. T. G. Lutz, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **284**, 419.
39. D. Lefier, R. Grappin and S. Pochet, *J. AOAC Int.*, 1996, **79**, 711.
40. A. Hashimoto and T. Kameoka, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 1005.
41. F. S. Parker, *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*, Plenum Press, New York, 1983.
42. B. B. Mishell and S. M. Shiigi, *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, New York, 1980.
43. D. J. Rawn, *Traité De Biochimie*, De Boeck Université et Éditions du renouveau pédagogique inc., Belgium, 1990.
44. W. Zhao, P. S. Devamanohara and S. D. Varma, *Free Radical Res.*, 2000, **33**, 23.
45. S. D. Allison, B. Chang, T. W. Randolph and J. F. Carpenter, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **365**, 289.
46. C. Ebel, H. Eisenberg and R. Ghirlando, *Biophys. J.*, 2000, **78**, 385.
47. Jean Barbeau, *Microbiologie Et Pathogénèse Des Infections Bucco-Faciales.*, Université de Montréal, Canada, 1993.
48. L. Trahan, *Biochimie Des Phosphates De Calcium Et De La Plaque Dentaire*, Université Laval, Canada, 1996.
49. D. E. Nivens, R. J. Palmer and D. C. White, *J. Ind. Microbiol.*, 1995, **15**, 263.
50. A. S. Landa, B. van de Belt-Gritter, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *Eur. J. Oral Sci.*, 1999, **107**, 236.

51. B. D. Hoyle, J. Alcantara and J. W. Costerton, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 2054.
52. X. Chen and P. S. Stewart, *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 2078.
53. S. R. Wood, J. Kirkham, P. D. Marsh, R. C. Shore, B. Nattress and C. Robinson, *J. Dent. Res.*, 2000, **79**, 21.
54. H. M. Reinl, A. Hartinger, P. Dettmar and T. M. Bayerl, *J. Invest. Dermatol.*, 1995, **15**, 291.
55. N. Bolister, M. Basker, N. A. Hodges and C. Marriott, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1991, **27**, 285.
56. A. S. Landa, H. C. Van Der Mei and H. J. Busscher, *Adv. Dent. Res.*, 1997, **11**, 528.
57. P. R. Majhi and S. P. Moulik, *Langmuir*, 1998, **14**, 3986.
58. J. R. Lu, T. J. Su, R. K. Thomas and J. Penfold, *Langmuir*, 1998, **14**, 6261.
59. M. T. Garcia, E. Campos, J. Sanchez-Leal and I. Ribosa, *Chemosphere*, 1999, **38**, 3473.
60. J. Y. Ikawa and J. S. Rossen, *J. Environ. Health*, 1999, **62**, 18.
61. P. Rental-Harper, M. Addy, J. Moran, F. M. Doherty and R. G. Newcombe, *J. Periodontol.*, 1996, **67**, 486.
62. L. Yiping and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 708.
63. K. Streletzky and G. D. J. Phillies, *Langmuir*, 1995, **11**, 42.
64. J. Leduc, C. Gauthier and J. Barbeau, *Journal Dentaire Du Québec*, 1999, **36**, 289.

65. F. Dousseau, M. Therrien and M. Pézolet, *Appl. Spectrosc.*, 1989, **43**, 538.
66. Molecular Probes, *Live/Dead® Backlight™ Bacterial Viability Kits*, 1999, USA.
67. J.-M. Millot, N. Allam and M. Manfait, *Anal. Chim. Acta*, 1994, **295**, 233.
68. S. J. Kwak, Communication personnelle.
69. S. Herles, S. Olsen, J. Afflitto and A. Gaffar, *J. Dent. Res.*, 1994, **73**, 1748.
70. H. Chardin, D. Septier and M. Goldberg, *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, **38**, 885.
71. A. Omri, C. Beaulac, M. Bouhajib, S. Montplaisir, M. Sharkawi and J. Lagacé, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1090.
72. H.-J. Kim, E. J. M. Gias and M. N. Jones, *Colloids Surf., A*, 1999, **149**, 561.

Annexe I

Tableau A-1 : Composition des mélanges ternaires.

Type de sucre	Rapport de bande IR		Ratio Sucre:protéine:ADN
	Sucre/protéine	Sucre/ADN	
alginate	2.1	5.9	1:1:0.75
alginate	1.6	4.0	0.75:1:0.75
alginate	0.84	1.8	0.5:1:0.75
mannan	4.9	10	1:1:0.35
mannan	3.4	8.9	0.75:1:0.35
mannan	1.9	5.7	1:1:0.35
xanthan	3.1	24	1:1:0.35
xanthan	2.7	20	0.75:1:0.35
xanthan	2.2	11	0.5:1:0.35
xanthan	1.6	1.2	0.25:1:1
xanthan	1.0	0.89	0.13:1:1
mannan	2.3	2.5	0.25:1:1
mannan	1.2	0.86	0.13:1:1
alginate	2.1	1.29	0.25:1:1
alginate	0.7	0.59	0.13:1:1
mannan/alginate	2.3	1.8	0.1:1:1
mannan/xanthan	0.85	0.72	0.1:1:1
xanthan	1.3	9.4	0.13:1:0.13
mannan	1.6	6.7	0.25:1:0.25
alginate	1.6	20	0.25:1:0.13
mannan	4.1	2.8	0.90:1:0.82
xanthan/alginate	1.1	8.9	0.20:1:0.20