



HAL
open science

Elaboration d'une nouvelle méthode hyperfréquence pour la détection et le suivi de croissance de biofilms bactériens

Matthieu Longo

► **To cite this version:**

Matthieu Longo. Elaboration d'une nouvelle méthode hyperfréquence pour la détection et le suivi de croissance de biofilms bactériens. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2023. Français. NNT : 2023BRES0020 . tel-04228212

HAL Id: tel-04228212

<https://theses.hal.science/tel-04228212>

Submitted on 4 Oct 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 638

Sciences de la Matière, des Molécules et Matériaux

Spécialité : Physique : Environnement et Biologie

Par :

Matthieu LONGO

Elaboration d'une nouvelle méthode hyperfréquence pour la détection et le suivi de croissance de biofilms bactériens

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 31 mars 2023

Unité de recherche :

Laboratoire des sciences et techniques de l'information, de la communication et de la connaissance – Lab-STICC UMR 6285
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin – LEMAR UMR 6539

Rapporteurs avant soutenance :

Hamid KOKABI Professeur, Sorbonnes Université
Alain DUFOUR Professeur, Université de Bretagne Sud

Composition du Jury :

Président :
Katia GRENIER Directrice de recherche, LAAS, Toulouse

Rapporteurs :
Hamid KOKABI Professeur, Sorbonnes Université
Alain DUFOUR Professeur, Université de Bretagne Sud

Examineurs :
Katia GRENIER Directrice de recherche, LAAS, Toulouse
Sophie SABLE Maître de conférence, HDR, La Rochelle Université
Stéphane RIOUAL Maître de conférences, HDR à l'Université de Bretagne Occidentale
Fabienne FAY Maître de conférences, HDR à l'Université de Bretagne Sud

Directeurs de thèse :
Benoît LESCOP Maître de conférences, HDR à l'Université de Bretagne Occidentale
Claire HELLIO Professeure, Université de Bretagne Occidentale

À ma famille,

« Savoir écouter, c'est posséder, outre le sien, le cerveau des autres. »

Léonard de Vinci

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permis de passer ces trois années de thèse dans de bonnes conditions. Tout d'abord, je remercie Géraldine SARTHOU, directrice du LEMAR ainsi que Christian PERSON, directeur du Lab-STICC, pour m'avoir permis de rejoindre les laboratoires de recherches et d'y effectuer mes travaux de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Hamid KOKABI et Alain DUFOUR pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux ainsi que Katia GRENIER et Sophie SABLE d'avoir accepté d'examiner mon travail pendant la soutenance.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel, Gérard TANNE et Sophie SABLE pour m'avoir prodigué de précieux conseils personnels et professionnels lors des entretiens annuels.

Quant à Benoît et Claire, vous m'avez proposé un sujet de thèse complexe et risqué. Vous avez néanmoins su m'accompagner tout au long de ce parcours semé d'embûches, trouver les bons mots lors des situations délicates et être présents lors des moments décisifs de cette thèse. Vous m'avez donné l'opportunité d'être l'axe central de ce projet riche et dense ayant forgé la personne que je suis aujourd'hui. Claire, tu as été tellement bienveillante avec moi, toujours positive et rassurante. Et ce, même lors de nos rencontres hasardeuses sur la plage de Sainte-Anne, alors que tu devais relire mon manuscrit et que j'étais censé en rédiger les différents chapitres ! Benoît, tu as toujours été présent, disponible et tu as dirigé cette thèse avec brio. Grâce à toi, je sais désormais que je peux vendre du sable au Sahara, et je ne l'oublierai pas. Je tiens donc à vous exprimer, tous les deux, ma profonde gratitude pour votre confiance, votre bienveillance et surtout, votre soutien au cours de cette aventure unique.

Stéphane, tes conseils et ton accompagnement pendant ces années de thèse ont été d'une qualité inégalée. Je dois avouer que j'ai mis du temps à effacer cette légère distance provenant de ma personnalité réservée, mais je n'oublierai jamais le simple « c'est bien ! » que tu m'as adressé lorsque je traversais une période difficile sur le plan personnel. Ces mots ont réveillé la motivation et l'envie qui me faisaient défaut à ce moment-là et qui ont été plus efficaces que n'importe quels autres compliments. Alors, pour toutes ces raisons, je te remercie grandement pour ton rôle primordial dans l'encadrement de cette thèse et pour l'indéfectible soutien que tu as su m'apporter.

Je remercie également Fabienne qui m'a donné l'opportunité d'utiliser les laboratoires du LBCM lors d'une période cruciale de ces travaux de recherche. Je te remercie grandement pour tes

nombreux conseils et remarques pertinentes apportés tout au long de ma thèse afin de me guider sur le droit chemin. Cette thèse n'aurait pas pu aboutir à un tel résultat sans ton aide précieuse.

Je tiens à remercier les collègues de la société Leo viridis qui ont joué un rôle important dans cette thèse. J'exprime des remerciements tout particuliers à Florian LELCHAT qui a apporté son expertise dans mes travaux et rendu cette thèse encore plus originale qu'elle ne l'était déjà. J'espère que les résultats de nos recherches feront l'objet d'un beau papier. Au-delà de la sphère professionnelle, Florian, tu es une personne pleine de qualités et j'ai sincèrement apprécié travailler avec toi.

Je suis reconnaissant envers tous ceux qui m'ont soutenus sur les plans scientifique et technique. Je commence par l'équipe de Biodimar : Marilyne, merci pour ton aide et tes conseils. Je suis vraiment désolé d'avoir placé des bactéries pathogènes dans l'étuve du laboratoire toute une nuit, depuis, la biosécurité est devenue ma priorité. Yannick, quel plaisir d'avoir pu envahir ta salle de TP avec mes potentiostats et mes échantillons étranges, merci pour tout. Merci à l'ensemble des équipes de Biodimar. Je remercie également Steven, Valentin et Fanny, qui ne sont plus au laboratoire aujourd'hui mais qui m'ont beaucoup soutenu lors de mes premiers pas en tant que chercheur.

Ensuite, j'adresse mes remerciements aux équipes du Lab-STICC et tout particulièrement à Philippe TALBOT qui m'a montré la voie fascinante de la caractérisation diélectrique des matériaux. Merci également à Vincent LAUR qui m'a fait apprécier davantage ce domaine d'étude.

Je tiens à témoigner de toute ma gratitude pour les images de qualité et les très bons moments passés aux côtés de Philippe ELIES, à la Plateforme d'Imagerie et de Mesure en Microscopie. C'est grâce à toi que j'ai pu apporter à cette thèse une toute autre dimension en ayant l'opportunité d'observer l'invisible et d'utiliser ton bel arsenal de microscope. Les cafés du matin en ta compagnie vont me manquer.

Julien, comment écrire ces remerciements sans toi ? Je suis tellement heureux d'avoir fait ta connaissance lors de ton arrivée au Lab-STICC. D'abord collègues de bureau, ensuite amis, nous avons passé de bons moments à attendre la stabilisation du signal OCP en discutant de sujets variés. Ton absence a été difficile après ton départ à l'Institut de la Corrosion, mais tes encouragements et nos soirées jeux m'ont permis de tenir bon. Alors je n'ai qu'un mot à te dire, merci !

Enfin, je tiens à remercier ma famille. Maman, Papa, je n'ai pas de mots assez forts pour vous exprimer ma reconnaissance. Quels que soient mes choix, vous me soutenez infailliblement. Vous avez toujours été présents, pour les moments heureux tout comme les instants difficiles. Sébastien, mon cher frère, tu as toujours été mon exemple. Je marche dans tes pas depuis tout petit et tu as souvent été là pour me changer les idées autour de nos passions communes. Mamé, malgré la distance qui nous sépare, je sais que tu es là et ton « poulet » préféré (oui, tout le monde le sait) te remercie pour le grand soutien que tu lui apportes. J'ai une pensée particulière pour Papylou qui, de là-haut, est fier de moi.

Enfin, la meilleure pour la fin, Rebecca, cette thèse sans toi aurait été comme naviguer sans gouvernail. C'est toi, qui m'as motivé au quotidien pour avancer. C'est toi, qui as su avoir les bons mots et garder ton calme quand j'étais prêt à jeter l'éponge. C'est toi, qui m'encourages à aller de l'avant quand les opportunités se présentent. C'est toi, qui me donnes tous ces fous rires (dont le fameux poisson passion). Pour terminer, c'est toi, qui as fait de cette thèse qui s'annonçait mouvementée un long fleuve tranquille. Alors je te remercie, du fond du cœur, pour tout ce dont tu m'as apporté et ce que tu m'apporteras encore dans le futur.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) dans le Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Information, de la Communication et de la Connaissance (Lab-STICC, UMR 6285) ainsi qu'au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR, UMR 6539) sous la supervision de Benoit LESCOP, MCF-HDR et Claire HELLIO, professeure à l'UBO, ainsi que la codirection de Stéphane RIOUAL et Fabienne FAY, MCFs-HDR. Ces travaux ont été financés par les contrats doctoraux des écoles doctorales Matière, Molécules et Matériaux (3M) et Sciences de la Mer et du Littoral (SML). Elle a bénéficié de l'appui et du soutien logistique de nombreux partenaires dont le Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Marines (LBCM), la plateforme de bioprospection BIODIMAR et la société Leo viridis. Cette thèse fait également partie de l'ANR CORSAIR (ANR-19-SARG-0006).



Valorisation de la thèse

Articles publiés

Longo, M., Rioual, S., Talbot, P., Faÿ, F., Hellio, C., & Lescop, B. (2022). A high sensitive microwave sensor to monitor bacterial and biofilm growth. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 36, 100493.

Pellé, J., **Longo, M.***, Le Poul, N., Hellio, C., Rioual, S., & Lescop, B. (2022). Electrochemical monitoring of the *Pseudomonas aeruginosa* growth and the formation of a biofilm in TSB media. *Bioelectrochemistry*, 108344. (*** Co-first author**).

Article en préparation

Longo, M., Lelchat, F.*, Le Baut, V., Rioual, S., & Lescop, B., Faÿ, F., Hellio, C. (2022). Tracking of bacteriophage predation on *Pseudomonas aeruginosa* using a new radiofrequency biofilm sensor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (*** Co-first author**).

Communications orales

Longo, M., Rioual, S., Talbot, P., Faÿ, F., Hellio, C., Lescop, B. (2020). Caractérisation hyperfréquence de biofilms marins. 16èmes Journées de Caractérisation Microondes et Matériaux, Toulouse, 30 mars - 1er avril 2020. **Prix Patrick Queffelec remporté à l'issue du congrès.**

Longo, M., Rioual, S., Talbot, P., Faÿ, F., Hellio, C., Lescop, B. (2020). Développement d'un capteur hyperfréquence pour la détection et le suivi de la formation de biofilms marins. Congrès Gen2Bio, visioconférence, 17 novembre 2020.

Longo, M., Rioual, S., Faÿ, F., Hellio, C., Lescop, B. (2020). High frequency characterization of marine biofilms. JED3M, Nantes, 4 novembre 2021.

Longo, M., Rioual, S., Talbot, P., Faÿ, F., Hellio, C., Lescop, B. (2022). Capteur hyperfréquence : caractérisation diélectrique des biofilms bactériens. Congrès Gen2Bio, La Baule, 24 - 25 mars 2022.

Longo, M., Rioual, S., Lelchat, F., Faÿ, F., Hellio, C., Lescop, B. (2022). Dielectric characterization: a real time passive technology for early biofilm detection. Workshop Biofouling Marin, Lorient, 8 - 10 novembre 2022.

Co-encadrement de stagiaire

HAEBERLI Gabrielle-Yasymi (2021). Assessment of the reliability and limitations of low-cost optical sensors for monitoring the growth of microorganisms. International Master's degree in Marine Biotechnology.

Articles dans la presse

1 an de Recherches « Matthieu LONGO reçoit le prix Patrick Queffelec » par Christian Brosseau, édition 2020.

Ouest-France « Un capteur de bactéries » par Anne Bertucci, édition de novembre 2021.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	17
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART	
I. BIOFILMS : UNE STRATEGIE ADAPTATIVE.....	26
1. UN MODE DE VIE TRIDIMENSIONNEL	26
2. LE MECANISME DE FORMATION DES BIOFILMS	28
3. UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE COMPLEXE.....	30
4. QUORUM SENSING : VERS UN COMPORTEMENT COMMUNAUTAIRE	33
II. DE MULTIPLES ENVIRONNEMENTS COLONISES.....	36
1. LES BIOFILMS EN MILIEU MARIN, PRECURSEURS DU BIOFOULING	36
2. LES BIOFILMS EN SANTE HUMAINE	38
3. RENFORCEMENT DE LA RESILIENCE BACTERIENNE PAR LES TRAITEMENTS TRADITIONNELS	42
4. DES ALTERNATIVES PROMETTEUSES	45
4.1. <i>Le quorum quenching : une stratégie efficace</i>	45
4.2. <i>La phagothérapie</i>	47
4.2.1. Avantages et inconvénients	47
4.2.2. Biologie des bactériophages	48
4.2.3. Adaptation des systèmes de défense bactériens	51
4.2.4. A retenir sur la phagothérapie.....	53
III. LES PRINCIPALES METHODES DE DETECTION ET DE MESURE DES BIOFILMS.....	54
1. METHODES CHIMIQUES, BIOLOGIQUES ET MOLECULAIRES	54
1.1. <i>Mesure de la biomasse totale</i>	54
1.2. <i>Marquage au cristal violet</i>	55
1.3. <i>Imagerie par résonance magnétique nucléaire</i>	56
1.4. <i>Hybridation in-situ en fluorescence</i>	57
2. METHODES D'OBSERVATION MICROSCOPIQUE	57
2.1. <i>Microscopie optique</i>	57
2.2. <i>Microscopie Raman</i>	58
2.3. <i>Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)</i>	59
2.4. <i>Microscope électronique à balayage</i>	61
3. METHODES ELECTROCHIMIQUES	63
3.1. <i>Electrode de type Clark</i>	63
3.2. <i>Potentiel de circuit ouvert (OCP)</i>	63
3.3. <i>Capteur de biofilm ALVIM</i>	64
3.4. <i>Spectroscopie d'impédance électrochimique</i>	64
3.4.1. Mode faradique.....	65
3.4.2. Mode non-faradique	66
4. AUTRES METHODES BIOLOGIQUES	67
4.1. <i>Détermination des unités formants de colonies (UFC)</i>	67
4.2. <i>Réaction de chaîne polymérase (q-PCR)</i>	67
4.3. <i>Réflectométrie des ultrasons</i>	68
5. BILAN COMPARATIF DES METHODES.....	68
IV. EMERGENCE DE TECHNIQUES RADIOFREQUENCES	71
1. PREAMBULE.....	71
2. UTILISATION DES CAPTEURS RADIOFREQUENCES POUR L'ETUDE DES MICRO-ORGANISMES	72
2.1. <i>Principe général</i>	72
2.2. <i>Différents capteurs pour la caractérisation des liquides</i>	73
2.2.1. Résonateurs.....	73
2.2.2. Sonde coaxiale à extrémité ouverte.....	76
V. BILAN BIBLIOGRAPHIQUE.....	77
REFERENCES	78

CHAPITRE II : UNE METHODE RADIOFREQUENCE POUR SUIVRE LA FORMATION D'UN BIOFILM EN TEMPS REEL

I.	INTRODUCTION	90
II.	MATERIEL ET METHODES	92
1.	SELECTION DE DEUX MODELES BACTERIENS POUR LA CONCEPTION D'UN CAPTEUR RADIOFREQUENCE.....	92
1.1.	<i>Vibrio natriegens : un modèle biotechnologique industriel</i>	92
1.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa : un modèle d'intérêt médical</i>	93
1.3.	<i>Cultures bactériennes.....</i>	94
2.	ELABORATION D'UN MODELE SIMPLIFIE POUR LA CONCEPTION DU CAPTEUR	95
2.1.	<i>Préparation d'échantillons représentatifs d'un biofilm</i>	95
2.2.	<i>Etude fondamentale des propriétés diélectriques des biofilms.....</i>	96
2.3.	<i>Conception du capteur radiofréquence : architecture et matériaux</i>	99
2.4.	<i>Préparation du capteur pour des mesures biologiques</i>	101
2.5.	<i>Analyses statistiques</i>	101
III.	ETUDES PRELIMINAIRES ET VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	102
1.	ANALYSES DE LA PERMITTIVITE DIELECTRIQUE	102
2.	VALIDATION DE LA SONDE HYPERFREQUENCE	107
2.1.	<i>Obtention du coefficient de réflexion S_{11}.....</i>	107
2.2.	<i>Détermination de la gamme fréquentielle des mesures.....</i>	107
IV.	MODELISATION NUMERIQUE.....	110
1.	CARTOGRAPHIE DES CHAMPS ELECTRIQUES EMIS.....	110
2.	DISTANCE D'IMMERSION DE LA SONDE	112
3.	EFFET DE LA PERMITTIVITE ELECTRIQUE ET DE LA CONDUCTIVITE.....	113
4.	SIMULATION DE LA CROISSANCE D'UN BIOFILM	115
5.	BILAN DES SIMULATIONS NUMERIQUES.....	118
V.	APPLICATION DU CAPTEUR SUR DES CAS REELS.....	119
VI.	CONCLUSIONS	126
	REFERENCES	127

CHAPITRE III : ELABORATION D'UN NOUVEAU MODELE ELECTROCHIMIQUE

I.	INTRODUCTION	132
II.	MATERIEL ET METHODES	134
1.	CULTURES CELLULAIRES	134
2.	CARACTERISATION ELECTROCHIMIQUE.....	135
2.1.	<i>Préparation de l'électrode de GC et fabrication de la cellule électrochimique</i>	135
2.2.	<i>Paramètres expérimentaux</i>	136
2.3.	<i>Observations au microscope électronique à balayage</i>	136
2.4.	<i>Analyses statistiques</i>	136
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	137
1.	SUIVI DU POTENTIEL CIRCUIT OUVERT	137
1.1.	<i>Concentration initiale nulle</i>	137
1.2.	<i>Impact de la concentration initiale sur le suivi de l'E_{oc}.....</i>	140
1.3.	<i>Effet de la température sur l'OCP</i>	141
2.	VOLTAMPEROMETRIE CYCLIQUE.....	143
3.	SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE	145
IV.	CONCLUSIONS	150
	REFERENCES	151

CHAPITRE IV : APPLICATION DE LA METHODE HYPERFREQUENCE DANS LE DOMAINE DE LA THERAPIE PHAGIQUE

I.	INTRODUCTION	154
II.	MATERIEL ET METHODES	157
1.	CULTURES BACTERIENNES.....	157
2.	ISOLATION ET CULTURE DES BACTERIOPHAGES	157
3.	MESURE DE DENSITE OPTIQUE.....	158
4.	EXTRACTION ET DEGRADATION DES EPS	158
5.	CARACTERISATIONS MICROSCOPIQUES	160
5.1.	<i>Etude de dégradation du biofilm par microscopie confocale à balayage laser</i>	<i>160</i>
5.2.	<i>Caractérisation morphologique des virus</i>	<i>162</i>
6.	CARACTERISATION HYPERFREQUENCE.....	163
6.1.	<i>Préparation du capteur et des mesures</i>	<i>163</i>
6.2.	<i>Analyses statistiques</i>	<i>164</i>
III.	ETUDE DE LA DEGRADATION VIRALE D'UN BIOFILM.....	165
1.	LIMITES D'UN SUIVI CLASSIQUE DE DENSITE OPTIQUE	165
2.	ETUDE MICROSCOPIQUE DE LA PREDATION PHAGIQUE.....	166
2.1.	<i>Caractérisation du biofilm de la souche PAO1</i>	<i>166</i>
2.2.	<i>Observation d'un échantillon soumis à la prédation des phages.....</i>	<i>171</i>
IV.	APPLICATION DE LA METHODE HYPERFREQUENCE.....	173
1.	PROPRIETES DIELECTRIQUES DES BACTERIOPHAGES.....	173
2.	ETUDE DE L'EFFET BACTERICIDE DES PHAGES AVEC LE CAPTEUR RADIOFREQUENCE.....	174
2.1.	<i>Evaluation de la synergie virale</i>	<i>174</i>
2.2.	<i>Relation prédateur / hôte</i>	<i>175</i>
V.	CONCLUSIONS	180
	REFERENCES	181
	CONCLUSION GENERALE.....	185

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : a - Photographie d'un biofilm de diatomées sur une roche ; b - Saumon atlantique, nécrose du pédoncule caudal provoquée par un biofilm de <i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>	26
Figure 2 : Architecture variable des biofilms. Les biofilms de cinq espèces (<i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>) ont été formés dans des conditions statiques sur des surfaces abiotiques pendant 24 h et ont été colorés avec le biomarqueur Syto9®, un marqueur d'acide nucléique fluorescent vert (adapté de Uruén et al., 2020).....	27
Figure 3 : Cycle de formation d'un biofilm	28
Figure 4 : Fonctionnement simplifié du quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif et positif.....	34
Figure 5 : Structure générale de la molécule de N-acyl-homosérine lactone accompagnée de quelques exemples de structures rencontrées chez des bactéries à Gram négatif.	35
Figure 6 : Organismes envahissants comprenant des diatomées (photos en haut à gauche), des bactéries (en bas à gauche), des zoospores d' <i>Ulva</i> sp. (en bas à droite) et une larve d' <i>Amphibalanus amphitrite</i> (en haut à droite) (adapté de Hellio & Yebra, 2009).	36
Figure 7 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. 1. Régulation des pompes à efflux, 2. Inactivation par hydrolyse, 3. Altération des récepteurs.	44
Figure 8 : Diagramme représentant les deux principales familles d'inhibiteurs du quorum sensing.	46
Figure 9 : Classification de plusieurs bactériophages selon leur type d'hôte et leur matériel génétique (Lelchat, 2020).	49
Figure 10 : Schéma représentant les deux principales voies d'infection et de répllication des bactériophages.	50
Figure 11 : Visualisation de deux réponses différentes à l'exposition aux phages de <i>Vibrio anguillarum</i> . (A) L'adsorption du phage Φ H20 observée dans les cellules ; (B) L'adsorption du phage Φ H20 n'est pas observée, indiquant une résistance dérivée de la mutation ; (C) Une sensibilité réduite aux phages KVP40 indique une tolérance médiée par le biofilm en réponse à l'exposition au phage (l'image est sans fluorescence) ; (D) Le lysat indique que les phages KVP40 ne s'adsorbent pas aux cellules, mais sont plutôt piégés dans la matrice du biofilm (adapté de Tan et al., 2015).....	52
Figure 12 : Biofilm de <i>S. aureus</i> marqué au cristal violet (adapté de Shukla & Rao, 2017).	55
Figure 13 : A) Un plan de coupe transversale à travers l'ensemble de données 3D d'un biofilm multi-espèce B) Le même plan est représenté après un traitement informatique. C) Reconstruction de volume en 3D, représentée sous 3 angles (rotation sur l'axe vertical) (adapté de Fysun et al., 2019).	56
Figure 14 : Spectres Raman obtenus à partir de cellules de souche PAO1 cultivées dans différentes conditions. De haut en bas : Inoculum de 48 heures, biofilm précoce à 2 μ m sous la surface de la lamelle de verre, cellules cultivées dans un milieu TSA à 48 heures, cellules traitées à l'EDTA à 48 heures (adapté de Sandt et al., 2007).	58
Figure 15 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.	60
Figure 16 : Organisation tridimensionnelle d'un biofilm mixte de <i>B. subtilis</i> (rouge) et <i>S. aureus</i> (vert). La barre d'échelle représente 50 μ m (adapté de Sanchez-Vizuete et al., 2015).....	61
Figure 17 : Biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>E. coli</i> observés au MEB. Différentes molécules anti-biofilm ont été testées : (A) témoin, (B) huile essentielle de thym (0,5 mg/ml) et (C,D) thymol (0,1 mg/ml) (Kerekes et al., 2019).	62
Figure 18 : Photographie d'un capteur ALVIM A001S3, approprié pour la plupart des applications industrielles.	64

Figure 19 : Circuit équivalent simple de la surface d'une électrode.....	65
Figure 20 : Image optique de la surface d'une électrode interdigitée (A) et images réalisées au MEB de doigts d'électrodes interdigités d'une architecture planaire (B) et 3D (C) (adapté de Brosel-Oliu et al., 2017).....	66
Figure 21 : Interaction d'une onde électromagnétique avec une cellule microbienne à différentes fréquences.....	72
Figure 22 : Structure du résonateur seul (a) et avec réservoir (b). Les données récoltées indiquent un décalage de résonance proportionnel à la concentration en glucose (c) (adapté de Qiang et al., 2017).....	74
Figure 23 : Variation de la capacité d'une cellule lymphatique unique en fonction du temps. La cellule est soumise à un traitement au méthanol afin d'entraîner la mort cellulaire. Extrait de Grenier et al., 2018.....	75
Figure 24 : Spectre général de permittivité diélectrique complexe d'une large gamme de fréquences.....	97
Figure 25 : Photographie de la sonde coaxiale Agilent plongée dans un des échantillons et schématisation du circuit équivalent de l'admittance de la sonde (C1 et C2 représentent les capacités parallèles et G est le terme dissipatif). ...	98
Figure 26 : Représentation de la permittivité complexe sous forme de diagramme vectoriel.....	99
Figure 27 : Impact de la température de l'eau sur la permittivité relative en traits pleins et les pertes diélectriques en pointillés (Andryieuski et al., 2015).	99
Figure 28 : Photographies représentant l'assemblage de la sonde ainsi que les deux types de capteur utilisés dans les essais de ce manuscrit.....	100
Figure 29 : Caractérisation diélectrique des solutions contenant des cellules bactériennes en suspension. De C0 à C4 : 0, 107, 108, 109 et 1010 UFC/ml.....	102
Figure 30 : Partie réelle de la permittivité complexe des sucres. De C0 à C4 : 0, 100, 150, 200 et 250 g/l.....	104
Figure 31 : Partie imaginaire de la permittivité complexe des sucres. De C0 à C4 : 0, 100, 150, 200 et 250 g/l.....	104
Figure 32 : Validation du dispositif expérimental : comparaison des mesures de différents liquides avec le matériel de référence.....	108
Figure 33 : Modélisation informatique du capteur. La pièce rouge représente la sonde, la partie blanche correspond au réservoir et la zone bleue est un liquide aux propriétés diélectriques variables. a) vue globale ; b) vue de face ; c) vue supérieure.....	110
Figure 34 : Modélisation HFSS de l'impact de la conductivité de la solution sur le champ électrique généré en bout de sonde.....	111
Figure 35 : Modélisation HFSS de l'impact de la hauteur de liquide sur le paramètre de réflexion S11.....	112
Figure 36 : Simulations HFSS de l'impact des variations de permittivité électrique et de conductivité sur le paramètre de réflexion S11.....	114
Figure 37 : Modélisation informatique du capteur prenant en compte la formation d'un biofilm (partie verte).	115
Figure 38 : Simulation HFSS de l'épaississement d'un biofilm. $\sigma_{\text{solution}} = 1,5 \text{ S/m}$; $\sigma_{\text{biofilm}} = 3,0 \text{ S/m}$; $\epsilon = 81$.	116
Figure 39 : Simulation HFSS de l'impact de la conductivité sur le coefficient de réflexion S11 pour une épaisseur de biofilm égale à 30, 50 et 100 μm	117
Figure 40 : Suivi de croissance de <i>V. natriegens</i> avec le capteur radiofréquence. A – Mesure du coefficient de réflexion S11 ; B – Variations normalisées obtenues sur 4 fréquences ; C – résultats des cinétiques de croissances obtenues par mesure de densité optique et coloration au cristal violet.	120
Figure 41 : Suivi de croissance de <i>P. aeruginosa</i> avec le capteur radiofréquence. A – Mesure du coefficient de réflexion S11 ; B – Variations normalisées obtenues sur 4 fréquences ; C – résultats des cinétiques de croissances obtenues par mesure de densité optique et coloration au cristal violet.	120
Figure 42 : Détermination de la formation du biofilm par renouvellement de milieu.....	123

Figure 43 : Photographies du capteur à deux sondes (extérieur/intérieur).....	123
Figure 44 : Impact du positionnement de la sonde et du revêtement de l'EPS MO245 sur la réponse du capteur pendant la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	125
Figure 45 : Photographie du dispositif électrochimique : A - Système à trois électrodes en fonctionnement au sein de la cage de Faraday ; B - Cellule électrochimique à vide.....	135
Figure 46 : Comparaison du suivi OCP (axe de gauche) à la croissance bactérienne et la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (axe de droite) à 37°C. La courbe orange est une moyenne de quatre enregistrements de l'EOC au cours du temps dont le nuage gris représente l'écart type.....	138
Figure 47 : Images des feuilles de graphite immergées en présence de <i>P. aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage.....	139
Figure 48 : Enregistrement du potentiel de circuit ouvert au cours du temps à partir de trois conditions de départ différentes : saturation en bactérie <1%, 10% et 100%.....	141
Figure 49 : Comparaison du suivi OCP (axe de gauche) à la croissance bactérienne et la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (axe de droite) à 19°C ± 2 °C.....	142
Figure 50 : Voltampérométrie cyclique de l'électrode en carbone vitreux dans une solution de Fe(CN) ₆ K ₃ pour différentes conditions. $v = 0.1 \text{ V.s}^{-1}$. $T = 19 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Le potentiel de départ est indiqué par la ligne noire verticale, la flèche indique la direction du scan.....	144
Figure 51 : Diagramme de Nyquist obtenu pour le carbone vitreux dans une solution de Fe(CN) ₆ K ₃ lors de différentes conditions. $T = 19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	146
Figure 52 : Diagramme de Bode obtenu pour le carbone vitreux dans une solution de Fe(CN) ₆ K ₃ lors de différentes conditions. $T = 19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	146
Figure 53 : Circuits équivalents proposés pour un système abiotique (a) et revêtu d'un biofilm (b).....	147
Figure 54 : Diagramme de Nyquist obtenu à l'aide du circuit équivalent proposé superposé des données expérimentales.....	148
Figure 55 : Mécanisme chronologique proposé basé sur les données expérimentales obtenues à 37°C.....	149
Figure 56 : Plaque de lyse des bactériophages sur une culture de <i>P. aeruginosa</i>	157
Figure 57 : Production et purification d'un EPS bactérien par fermentation.....	158
Figure 58 : Schématisation de la méthodologie employée pour la préparation des échantillons afin d'observer la dégradation d'un biofilm par les bactériophages.....	161
Figure 59 : Images du phage Domino-17 (Myoviridae) au microscope électronique à transmission.....	162
Figure 60 : Photographies du dispositif expérimental utilisé pour la caractérisation hyperfréquence des échantillons contaminés par les bactériophages. a – Capteur en acier inoxydable ; b – Analyseur de réseau vectoriel et programme d'automatisation LabView reliés à l'étuve contenant le capteur ; c – Capteur maintenu à la verticale à l'intérieur de l'étuve.....	163
Figure 61 : Cinétique de croissance de <i>P. aeruginosa</i> suite à l'injection de phages 6 heures après le départ des mesures.....	165
Figure 62 : Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> observé au microscope confocal après 24 heures de croissance en l'absence de bactériophages (échantillon n°1). a – reconstitution en trois dimensions du biofilm ; b – coupes orthogonales.....	168
Figure 63 : Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> observé au microscope confocal après 24 heures de croissance en l'absence de bactériophages (échantillon n°2). Observation d'une zone de relief important. a – reconstitution en trois dimensions	

du biofilm ; b – réalisation d’une seconde reconstitution d’une section de l’image a avec un grossissement plus important ; c – visualisation en deux dimensions d’une face de l’image b.	169
Figure 64 : Observation d’un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> infecté par les bactériophages après 20 heures d’exposition aux virus. a – reconstitution en trois dimensions de la zone étudiée ; b – image en deux dimension selon les axes x, y d’une section contenant un amas cellulaire ; c – coupes orthogonales.	171
Figure 65 : Caractérisation hyperfréquence des bactériophages en suspension dans le milieu de culture M1.	173
Figure 66 : Etude de l’effet synergique d’un cocktail de phage comparé à l’utilisation d’un phage unique pour l’inhibition de croissance de <i>P. aeruginosa</i> . Mesures réalisées avec le capteur radiofréquence, $f = 300$ MHz.	175
Figure 67 : Etude de l’effet inhibiteur du cocktail de phages sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i> réalisée avec le capteur radiofréquence, $f = 300$ MHz.	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Proportion des composants d’une matrice de biofilm type	31
Tableau 2 : Maladies associées aux biofilms dans différents systèmes corporels et leurs organes affectés.	40
Tableau 3 : Ensemble des techniques de détection et de mesure des biofilms.	70
Tableau 4 : Concentrations des gammes réalisées dans de l’eau purifiée.	96
Tableau 5 : Variabilité de la permittivité complexe des échantillons par rapport à la référence (eau purifiée à 20°C).	106
Tableau 6 : Atténuations théoriques de signal correspondantes aux valeurs de décibel.	107
Tableau 7 : Erreur de mesure du VNA MS2037C/Capteur par rapport à l’analyseur 8753ES.	109
Tableau 8 : Paramètres EIS obtenus à partir de l’ajustement des courbes expérimentales utilisant le circuit équivalent proposé en figure 53 pour une électrode immergée dans un milieu de culture TSB avec différentes densités cellulaires.	147

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	ICTV : Comité international de taxonomie des virus
AHL : N-acyl-homosérine lactone	MEB : Microscope électronique à balayage
AI : Auto-inducteur	MET : Microscope électronique à transmission
ANOVA : Analyse de la variance	MOI : Multiplicité d'infection virale
CE : Contre électrode	NB : Milieu de culture Nutrient Broth
CLSM : Microscope confocal à balayage laser	OCP : Potentiel de circuit ouvert
CV : Cristal violet / voltamétrie cyclique	PCR : Amplification en chaîne par polymérase
dB : Décibel	pH : Potentiel hydrogène
DO : Densité optique	QQ : Quorum quenching
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique	QS : Quorum sensing
EIS : Spectroscopie d'impédance électrochimique	QSI : Inhibiteur du quorum sensing
E_{oc} : Potentiel de circuit ouvert	RE : Electrode de référence
EPS : Substance polymérique extracellulaire	RF : Fréquences radio
FISH : Fluorescence in situ par hybridation	RMN : Résonance magnétique nucléaire
GC : Carbone vitreux	SBF : Indice de formation spécifique de biofilm
GFP : Protéine verte fluorescente	TSB : Milieu de culture Tryptic Soya Broth
HF : Haute fréquence	VNA : Analyseur de réseau vectoriel
HFSS : Simulateur de systèmes haute fréquence	WE : Electrode de travail

INTRODUCTION GENERALE

Dans les domaines industriels en relation avec l'eau, l'alimentation, la médecine et la navigation, l'une des difficultés récurrente est la formation de biofilms (Flemming *et al.*, 2009; Plouguerne *et al.*, 2008). De manière générale, le biofouling (également appelé salissure biologique) est défini comme étant la croissance et l'agglomération d'organismes vivants sur des surfaces (Flemming *et al.*, 2009). Sur la base d'études récentes, il est largement reconnu que le biofouling a des impacts négatifs dans de nombreuses industries et peut parfois leur coûter leur rentabilité (Tuck *et al.*, 2022). Le biofouling dans le secteur médical implique uniquement la formation de biofilms microbiens, contrastant avec le biofouling dans les industries marines, manufacturières et alimentaires, qui implique une combinaison de biofilms, de macrofouling et d'entartrage (Bixler & Bhushan, 2012). La majorité des encrassements biologiques débutent par la formation d'un biofilm microbien. Cette colonisation biologique des surfaces entraîne un large éventail d'effets néfastes accompagnés d'importants surcoûts dans divers secteurs industriels.

Biofouling dans les industries marines

À l'échelle mondiale, plus de quatre mille espèces marines ont été associées à l'encrassement biologique, ce qui constitue une menace sérieuse pour les parcs marins et les aquacultures (Bressy & Lejars, 2014; Dobretsov *et al.*, 2006). Les salissures biologiques marines peuvent être classées en deux catégories : les micro-salissures (qui impliquent l'accumulation de micro-organismes) et les macro-salissures (définies par l'accumulation de macro-organismes tels que les invertébrés), qui peuvent également être divisées en macro-salissures molles et dures (Kutz, 2018). Selon Abioye *et al.* (2019), les bactéries marines sont prédominantes parmi ces organismes car elles colonisent rapidement les substrats, adhèrent à une large gamme de surfaces et produisent de nombreux métabolites aux propriétés antifongiques et antimicrofouling. Notamment, certaines études ont décrit les micro-organismes impliqués dans le biofouling comme formant des microcouches, qui initient ensuite l'adhésion de macro-organismes (macrofouling) (De Carvalho, 2018; Kutz, 2018; Plouguerne *et al.*, 2008). Les salissures biologiques marines se présentent sous la forme d'une croissance aquatique d'organismes vivants sur les structures sous-marines qui, avec le temps, peut causer des contraintes physiques sur les moteurs des navires, stimuler la biocorrosion des métaux et nuire aux environnements de mariculture (Bixler & Bhushan, 2012; Bressy & Lejars, 2014). Un biofilm d'un millimètre d'épaisseur accentue de 80 % la traînée de friction des coques de navires, ce qui provoque une perte de vitesse globale (Gordon & Mawatari, 1992), augmente la consommation de carburant (avec émission de gaz à effet de serre) et entraîne des coûts de maintenance élevés.

De plus, en raison de l'expansion rapide de l'aquaculture, un certain nombre d'épidémies d'origine microbiennes ont été signalées, entraînant de lourdes pertes économiques. L'aquaculture est devenue très sensible aux infections bactériennes en raison de la présence des biofilms (Pandey & Kumar, 2021). Dans cette industrie, la formation de biofilms est problématique du départ (avant la récolte) jusqu'à la fin (après la récolte) des processus (Cai & Arias, 2017). La liste des pathogènes et des espèces touchées, qui représentent aussi un vecteur de transmission pour l'Homme, comporte plusieurs centaines d'espèces (Cai & Arias, 2017).

Biofouling dans les industries alimentaires

Dans l'industrie alimentaire, la formation de biofilms est présente dans les appareils de traitement et les systèmes de tuyauterie. Cela provoque des contaminations fréquentes, des conditions d'hygiène qui laissent à désirer, la corrosion de l'équipement alimentaire, la détérioration des aliments, la diminution de la durée de conservation des produits alimentaires et l'émergence de maladies d'origine alimentaire (Cloete *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2015). Ces contraintes entraînent à leur tour des complications fonctionnelles et hygiéniques avec des pertes financières prononcées et des risques pour la santé humaine (Gule *et al.*, 2016). La gravité des maladies peut aller d'une simple gastro-entérite à des complications potentiellement mortelles, notamment des anomalies hépatiques, méningites et bien d'autres.

Les différents paramètres environnementaux favorisent la persistance des biofilms dans les industries alimentaires, entraînant la détérioration générale des appareils sensibles aux bio-encrassements (canalisations, réservoirs, outils d'emballage, matériaux de stockage, tubes de distribution et plaques de pasteurisation) qui sont fabriqués en métaux et alliages (Galie *et al.*, 2018). Soixante pour cent des infections d'origine alimentaire sont dues au transfert de biofilms des équipements de transformation des aliments aux produits alimentaires transformés (Bridier *et al.*, 2015). En outre, ces micro-organismes fixés à la surface ne peuvent pas être facilement éliminés car ils sont très résistants aux agents antimicrobiens, contribuant à de graves risques sanitaires (Cloete *et al.*, 2009). Parmi les diverses bactéries qui forment des biofilms, *Escherichia coli* a été signalée comme l'agent pathogène alimentaire le plus tenace (Gule *et al.*, 2016).

Biofouling dans les industries médicales

L'encrassement biologique dans le domaine de la santé peut se produire dans les dispositifs médicaux, notamment les cathéters, les lentilles de contact, les implants prothétiques, les implants mammaires, les implants dentaires, les produits de remplissage des tissus et les biocapteurs. Avec l'augmentation de l'utilisation de ces dispositifs médicaux, le risque d'infections par biofilm a également augmenté (Del Pozo, 2018). La plupart de ces dispositifs médicaux sont fabriqués à partir de polymères, de céramiques et de matériaux composites, des substrats favorables pour l'adhésion bactérienne (Khatoon *et al.*, 2018). L'encrassement biologique des dispositifs implantés débute peu après l'insertion du dispositif, lorsque les adhésines dérivées de l'hôte forment une couche conditionnelle et attirent les cellules planctoniques afin qu'elles se fixent à la surface de l'implant. Suite aux étapes de formation du biofilm, la signalisation bactérienne se produit et la souche persiste (Darouiche, 2004). Les biofilms sur les dispositifs médicaux peuvent provenir de la peau du patient, du personnel soignant ou du milieu environnant (LoVetri *et al.*, 2010). Cela peut entraîner divers effets néfastes, notamment des maladies liées aux implants, un mauvais fonctionnement des dispositifs et le rejet des implants (Carvalho *et al.*, 2021). Selon Bixler et Bhushan (2012), environ 45% des infections nosocomiales sont attribuées à des maladies liées aux implants, avec plus de 5000 décès par an.

Détection et traitement des biofilms microbiens

Pour toutes les raisons citées précédemment, de nombreuses molécules antibiotiques sont utilisées afin d'éradiquer les biofilms microbiens. Mais la résistance aux antimicrobiens est la conséquence inévitable de l'utilisation intensive d'antibiotiques. Il s'agit d'un problème critique, en particulier dans les milieux aquatiques, en raison du faible nombre de nouveaux composés disponibles et non toxiques pour l'environnement (Ytreberg *et al.*, 2021). Ce problème est d'autant plus pertinent lorsqu'il est associé à des biofilms microbiens, car les micro-organismes qui se développent dans ces structures présentent une sensibilité réduite aux antibiotiques (Wu *et al.*, 2015). Les biofilms sont des communautés denses responsables de la majorité des colonisations secondaires (microfouling et macrofouling) ainsi que de nombreuses infections cliniques humaines (Malik *et al.*, 2013; Zardus *et al.*, 2008). En outre, une caractéristique importante des biofilms est la capacité des micro-organismes à communiquer et collaborer afin de survivre dans des conditions difficiles. Ce mécanisme de communication intercellulaire peut contrôler d'importants facteurs de virulence tels que la formation et la maturation des biofilms, la résistance aux antibiotiques ou l'interaction bactérie-hôte (Paluch *et al.*, 2020).

Les problèmes associés aux biofilms bactériens sont à l'origine de la recherche de méthodologies innovantes impliquant à la fois la collecte d'informations en temps réel et la détection de la formation des structures microbiologiques complexes des biofilms avec des caractérisations rapides et précises. Alors que l'imagerie permet d'obtenir des informations visuelles sur le biofilm (par exemple, en utilisant des colorants pour mettre en évidence des caractéristiques spécifiques du biofilm) (Schulz & Semmler, 2008), les méthodologies de détection se concentrent sur la quantification des analytes ou la caractérisation des propriétés du biofilm (McGrath & Scanail, 2013). En particulier, les nouveaux dispositifs de détection visent à surmonter certaines des limites des méthodes d'analyse actuelles qui impliquent généralement une analyse invasive et destructive. Les capteurs ont été utilisés pour étudier les biofilms sous deux aspects principaux : (1) la croissance du biofilm (Subramanian *et al.*, 2020) et (2) la dynamique d'indicateurs spécifiques dans le biofilm (Saccomano *et al.*, 2021).

La recherche sur la croissance du biofilm se concentre généralement sur la dynamique de la formation du biofilm afin d'identifier les étapes de l'assemblage du biofilm, l'objectif étant de comprendre de quelle manière le processus de développement du biofilm est affecté par différents signaux chimiques ou physiques. Un large éventail de dispositifs de détection pour l'évaluation des biofilms repose sur les capteurs optiques, électrochimiques et mécaniques. En raison de la nature hétérogène de la structure du biofilm, des techniques de détection spécifiques doivent être développées.

Objectif de la thèse

Dans l'ensemble, les biofilms sont difficiles à éradiquer et le nombre croissant d'infections par des souches résistantes aux antibiotiques devrait avoir un impact important sur l'avenir des économies mondiales. De plus, les techniques de détection actuelles sont limitées par de nombreux aspects, ne permettant pas d'effectuer d'analyses rapides et peu coûteuses. Face à ce besoin de méthode de détection fiable, cette thèse se concentre sur l'élaboration d'une approche innovante pour la détection des biofilms dès leur stade précoce. Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres.

○ **Chapitre I : Etat de l'art**

Un état de l'art est présenté afin de définir les notions nécessaires à la compréhension de ces travaux de thèse et mettre en avant le cheminement de pensée ayant permis l'identification des problématiques traitées.

○ **Chapitre II : Une méthode radiofréquence pour suivre la formation d'un biofilm en temps réel**

Le développement d'un nouveau capteur a été réalisé afin d'étudier les caractéristiques électriques de deux biofilms bactériens au cours de leur croissance. Dans un premier temps, la sonde électromagnétique fabriquée a été soumise à une batterie de tests afin de valider son applicabilité dans l'étude de matériaux biologiques. Ensuite, des simulations informatiques ont été réalisées afin d'étudier les paramètres impactant les mesures du capteur. Enfin, deux modèles bactériens ont été sélectionnés afin de réaliser des suivis de croissance en temps réel avec cette nouvelle méthode.

○ **Chapitre III : Elaboration d'un nouveau modèle électrochimique**

Le suivi du potentiel en circuit ouvert et la spectroscopie d'impédance électrochimique ont été réalisés afin de suivre la formation d'un biofilm de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Ces techniques basses fréquences ont permis d'élaborer un tout nouveau modèle électrochimique, spécifique aux conditions employées, permettant d'accroître notre compréhension des processus électrochimiques mis en jeu lors de la colonisation d'une surface par les cellules bactériennes.

○ **Chapitre IV : Application de la méthode hyperfréquence dans le domaine de la thérapie phagique**

A la suite de ces chapitres, le capteur radiofréquence est capable d'identifier plusieurs phases dans la dynamique de formation d'un biofilm. Ainsi, le capteur a pu être employé pour valider une étude concernant l'activité lytique d'un bactériophage sur la bactérie *P. aeruginosa*. Cette étude a permis de souligner le fort potentiel du capteur radiofréquence en tant que solution complémentaire pour l'étude de processus biologiques.

Références

- Bixler, G.D., Bhushan, B., 2012. Biofouling: lessons from nature. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 370, 2381–2417.
- Bressy, C., Lejars, M., 2014. Marine fouling: An overview. *J. Ocean Technol.* 9, 19–28.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naitali, M., Briandet, R., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178.
- Cai, W., Arias, C.R., 2017. Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. *J. Aquat. Anim. Health* 29, 95–104.
- Carvalho, F.M., Teixeira-Santos, R., Mergulhão, F.J., Gomes, L.C., 2021. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: A systematic review. *AIMS Mater. Sci.* 8, 501–523.
- Cloete, E., Molobela, I., Van Der Merwe, A., Richards, M., 2009. Biofilms in the food and beverage industries: an introduction, in: *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Elsevier, pp. 3–41.
- Darouiche, R.O., 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350, 1422–1429.
- De Carvalho, C.C., 2018. Marine biofilms: a successful microbial strategy with economic implications. *Front. Mar. Sci.* 5, 126.
- Del Pozo, J.L., 2018. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 16, 51–65.
- Dobretsov, S., Dahms, H.-U., Qian, P.-Y., 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22, 43–54.
- Flemming, H.-C., Murthy, P.S., Venkatesan, R., Cooksey, K., 2009. *Marine and industrial biofouling*. Springer.
- Galie, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2018. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9, 898.
- Gordon, D.P., Mawatari, S.F., 1992. *Atlas of marine-fouling Bryozoa of New-Zealand ports and harbours*. Misc. Publ. N. Z. Oceanogr. Inst.
- Gule, N.P., Begum, N.M., Klumperman, B., 2016. Advances in biofouling mitigation: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 535–555.
- Khatoon, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E.J., Mah, T.-F., Alarcon, E.I., 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4, e01067.
- Kutz, M., 2018. *Handbook of environmental degradation of materials*. William Andrew.
- LoVetri, K., Gawande, P.V., Yakandawala, N., Madhyastha, S., 2010. Biofouling and anti-fouling of medical devices. *Biofouling Types Impact Anti-Fouling* 105–128.
- Malik, A., Mohammad, Z., Ahmad, J., 2013. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 7, 101–107.
- McGrath, M.J., Scanail, C.N., 2013. *Sensor technologies: healthcare, wellness, and environmental applications*. Springer Nature.
- Moreira, J.M.R., Gomes, L.C., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2015. The impact of material properties, nutrient load and shear stress on biofouling in food industries. *Food Bioprod. Process.* 95, 228–236.
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K., 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1871–1881.
- Pandey, P.K., Kumar, V.S., 2021. Biofilm in aquaculture production, in: *Advances in Fisheries Biotechnology*. Springer, pp. 401–422.
- Plouguerne, E., Hellio, C., Deslandes, E., Veron, B., Stiger-Pouvreau, V., 2008. Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*.
- Saccomano, S.C., Jewell, M.P., Cash, K.J., 2021. A Review of chemosensors and biosensors for monitoring biofilm dynamics. *Sens. Actuators Rep.* 3, 100043.
- Schulz, R.B., Semmler, W., 2008. Fundamentals of optical imaging. *Mol. Imaging I* 3–22.
- Subramanian, S., Huiszoon, R.C., Chu, S., Bentley, W.E., Ghodssi, R., 2020. Microsystems for biofilm characterization and sensing—A review. *Biofilm* 2, 100015.
- Tuck, B., Watkin, E., Somers, A., Machuca, L.L., 2022. A critical review of marine biofilms on metallic materials. *Npj Mater. Degrad.* 6, 1–12.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., Song, Z.-J., 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7.
- Ytreberg, E., Lagerström, M., Nöu, S., Wiklund, A.-K.E., 2021. Environmental risk assessment of using antifouling paints on pleasure crafts in European Union waters. *J. Environ. Manage.* 281, 111846.
- Zardus, J.D., Nedved, B.T., Huang, Y., Tran, C., Hadfield, M.G., 2008. Microbial biofilms facilitate adhesion in biofouling invertebrates. *Biol. Bull.* 214, 91–98.

CHAPITRE I

Etat de l'art

I.	BIOFILMS : UNE STRATEGIE ADAPTATIVE.....	26
1.	UN MODE DE VIE TRIDIMENSIONNEL	26
2.	LE MECANISME DE FORMATION DES BIOFILMS	28
3.	UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE COMPLEXE.....	30
4.	QUORUM SENSING : VERS UN COMPORTEMENT COMMUNAUTAIRE	33
II.	DE MULTIPLES ENVIRONNEMENTS COLONISES.....	36
1.	LES BIOFILMS EN MILIEU MARIN, PRECURSEURS DU BIOFOULING	36
2.	LES BIOFILMS EN SANTE HUMAINE	38
3.	RENFORCEMENT DE LA RESILIENCE BACTERIENNE PAR LES TRAITEMENTS TRADITIONNELS	42
4.	DES ALTERNATIVES PROMETTEUSES	45
4.1.	<i>Le quorum quenching : une stratégie efficace</i>	45
4.2.	<i>La phagothérapie</i>	47
III.	LES PRINCIPALES METHODES DE DETECTION ET DE MESURE DES BIOFILMS.....	54
1.	METHODES CHIMIQUES, BIOLOGIQUES ET MOLECULAIRES	54
1.1.	<i>Mesure de la biomasse totale</i>	54
1.2.	<i>Marquage au cristal violet</i>	55
1.3.	<i>Imagerie par résonance magnétique nucléaire</i>	56
1.4.	<i>Hybridation in-situ en fluorescence</i>	57
2.	METHODES D'OBSERVATION MICROSCOPIQUE	57
2.1.	<i>Microscopie optique</i>	57
2.2.	<i>Microscopie Raman</i>	58
2.3.	<i>Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)</i>	59
2.4.	<i>Microscope électronique à balayage</i>	61
3.	METHODES ELECTROCHIMIQUES	63
3.1.	<i>Electrode de type Clark</i>	63
3.2.	<i>Potentiel de circuit ouvert (OCP)</i>	63
3.3.	<i>Capteur de biofilm ALVIM</i>	64
3.4.	<i>Spectroscopie d'impédance électrochimique</i>	64
4.	AUTRES METHODES BIOLOGIQUES	67
4.1.	<i>Détermination des unités formants de colonies (UFC)</i>	67
4.2.	<i>Réaction de chaîne polymérase (q-PCR)</i>	67
4.3.	<i>Réflectométrie des ultrasons</i>	68
5.	BILAN COMPARATIF DES METHODES.....	68
IV.	EMERGENCE DE TECHNIQUES RADIOFREQUENCES.....	71
1.	PREAMBULE.....	71
2.	UTILISATION DES CAPTEURS RADIOFREQUENCES POUR L'ETUDE DES MICRO-ORGANISMES	72
2.1.	<i>Principe général</i>	72
2.2.	<i>Différents capteurs pour la caractérisation des liquides</i>	73
V.	BILAN BIBLIOGRAPHIQUE.....	77
	REFERENCES	78

I. BIOFILMS : UNE STRATEGIE ADAPTATIVE

1. Un mode de vie tridimensionnel

Les biofilms ont été observés pour la première fois au XVII^{ème} siècle, mais le terme « biofilm » n'a été créé qu'en 1987 par J. W. Costerton. Un biofilm est défini comme étant une communauté structurée de cellules microbiennes adhérentes fixées à une surface au sein d'une matrice d'exopolysaccharides (Costerton *et al.*, 1999, 1987). Souvent symbiotiques, les biofilms peuvent se développer sur quasiment toutes les surfaces naturelles, organiques et inorganiques (Bjarnsholt *et al.*, 2018). Ce processus s'intègre dans le cycle de vie de la plupart des micro-organismes, évoluant en coopération et produisant des phénotypes différenciés conduisant à des fonctions spécifiques, parfois en réaction à un stress tel qu'un changement de température, de pH, une limitation de nutriments ou encore une réponse du système immunitaire.

Le développement des biofilms correspond à l'un des deux modes de comportement des organismes unicellulaires, l'alternative étant la flottaison libre de type planctonique dans un milieu liquide. Les biofilms microbiens constituent un mode de vie communautaire fixe, permettant aux micro-organismes de coloniser des niches écologiques très diverses (Flemming *et al.*, 2021). Souvent observés dans les milieux aqueux ou exposés à l'humidité, comme illustré en figure 1, ils peuvent également se développer sur n'importe quel type de surface immergée, naturelle ou artificielle, minérale (figure 1a) ou organique (figure 1b), industrielle (canalisations, coques des navires) ou médicale (prothèses, cathéters). Ils influencent profondément la santé humaine en participant à de nombreux cycles écologiques bénéfiques ou à des applications biotechnologiques, mais aussi à des infections chroniques ou à des processus de biocorrosion.

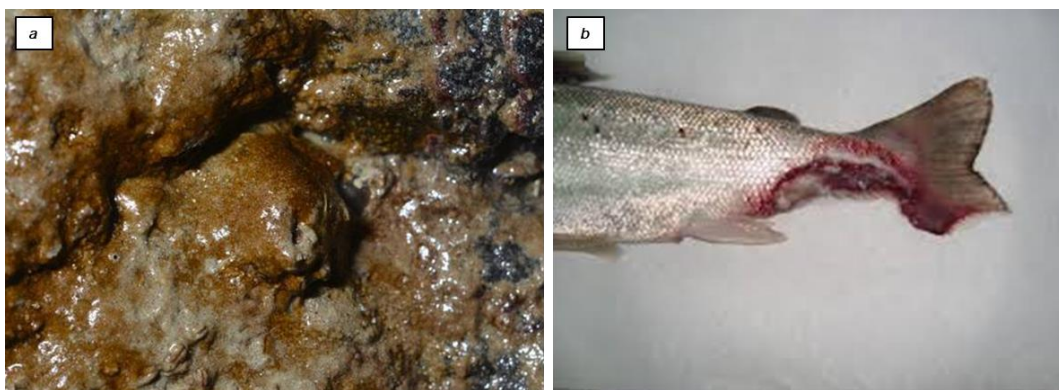


Figure 1 : a - Photographie d'un biofilm de diatomées sur une roche ; b - Saumon atlantique, nécrose du pédoncule caudal provoquée par un biofilm de *Tenacibaculum dicentrarchi*

Ce type de développement est possible grâce à la production d'une matrice extracellulaire, qui décrit un panel complexe de molécules chimiquement diverses jouant des rôles variés dans l'architecture et les fonctions du biofilm (Karygianni *et al.*, 2020). La composition dépend fortement de la diversité des micro-organismes et des conditions environnementales (Guillonneau *et al.*, 2018; Wickramasinghe *et al.*, 2020). Comme le montre la figure 2, les cellules participent fortement à la formation et à la plasticité de l'organisation spatiale du biofilm, se traduisant par une grande diversité d'architectures (Bridier *et al.*, 2010; Kowalski *et al.*, 2020). Les biofilms de *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* ont en général une architecture sous forme d'amas cellulaires. Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dressent quant à eux une architecture sous forme d'amas contre une structure plus filamenteuse pour *Salmonella enterica* (Uruén *et al.*, 2020).

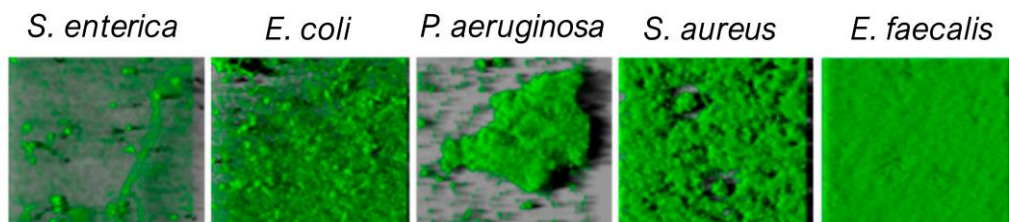


Figure 2 : Architecture variable des biofilms. Les biofilms de cinq espèces (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) ont été formés dans des conditions statiques sur des surfaces abiotiques pendant 24 h et ont été colorés avec le biomarqueur Syto9®, un marqueur d'acide nucléique fluorescent vert (adapté de Uruén *et al.*, 2020).

Le terme biofilm a récemment été controversé, car il évoque une forme « plane » et ne reflète pas suffisamment l'architecture complexe à l'origine des propriétés du biofilm (Flemming *et al.*, 2021). La production de la matrice polymérique extracellulaire et l'expansion en trois dimensions du biofilm conduisent en effet à une hétérogénéité des phénotypes due à des gradients chimiques au sein de la structure. Cette hétérogénéité est considérée comme une caractéristique des biofilms et son étude est essentielle afin de comprendre la manifestation de propriétés fonctionnelles spécifiques (Beloin & McDougald, 2021). Les interactions écologiques entre les espèces jouent également un rôle majeur dans la construction structurelle des biofilms. L'organisation dimensionnelle entre les espèces au sein du biofilm dépend à la fois des interactions locales, de la physiologie spécifique des espèces et des conditions environnementales. En outre, certaines études ont récemment souligné que la diversité génétique des espèces peut conduire à l'évolution du comportement global, affectant réciproquement l'architecture du biofilm (Arjes *et al.*, 2021; France *et al.*, 2019).

2. Le mécanisme de formation des biofilms

Diverses forces, tant attractives que répulsives, entrent en jeu lorsque les cellules bactériennes abordent une surface. À moins de 20 nm de celle-ci, les charges négatives de la paroi bactérienne sont repoussées par les charges négatives de la plupart des surfaces (Palmer *et al.*, 2007). Cette répulsion peut toutefois être surmontée par l'utilisation de *fimbriae* et de flagelles pour assurer une fixation mécanique à la surface (Palmer *et al.*, 2007). La croissance du biofilm s'effectue via une série d'événements physiques, chimiques et biologiques qui se déroulent en plusieurs étapes (figure 3).

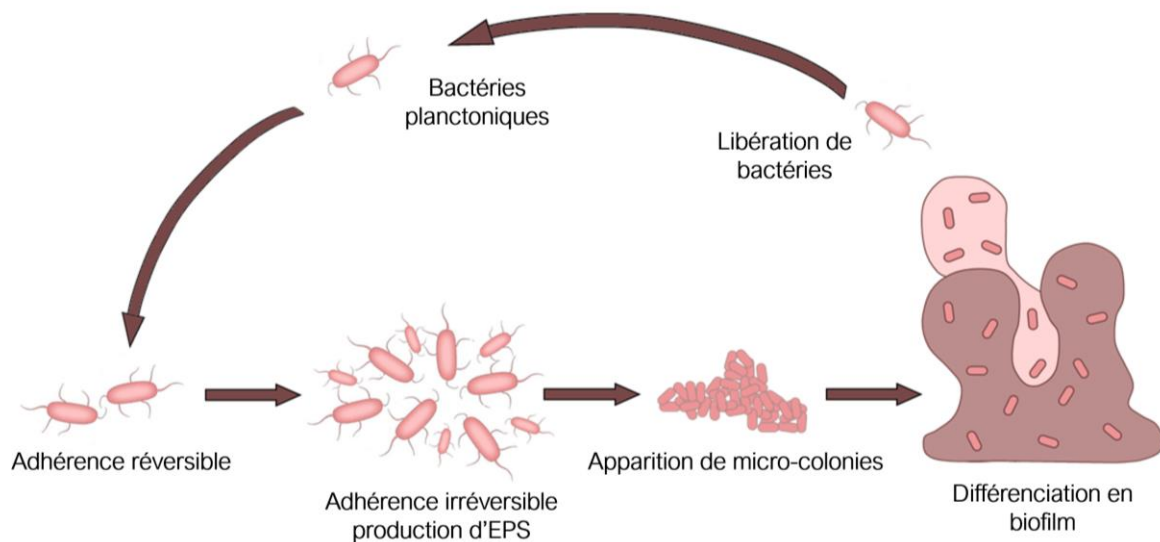


Figure 3 : Cycle de formation d'un biofilm

L'étape d'attachement peut être classée en deux catégories : attachement initial réversible et attachement irréversible (Renner & Weibel, 2011). Lors de l'attachement initial, les flagelles sont essentiels aux interactions entre les cellules et la surface. Cependant, si le substrat n'est pas optimal pour l'adhésion, les organismes peuvent se détacher (Hou *et al.*, 2018). En général, les matériaux hydrophobes et les surfaces rugueuses sont plus favorables à l'adhésion microbienne que les matériaux hydrophiles et lisses (Donlan, 2002). Les micro-organismes adhèrent à ces surfaces qui sont ensuite modifiées pour développer une charge de surface (Subhadra *et al.*, 2018) qui aide à attirer et à faire adhérer les micro-organismes. La formation des biofilms est généralement divisée en quatre étapes distinctes : (1) transport des bactéries vers la surface d'un substrat, (2) adhésion réversible des bactéries à la surface d'un substrat, (3) transition de l'adhésion réversible à l'adhésion irréversible des bactéries, (4) propriétés émergentes associées à la formation du biofilm (par exemple la production de substances polymériques extracellulaires ou l'apparition de gradients localisés en nutriments et oxygène) (Flemming *et al.*, 2016).

L'implication de la physico-chimie dans la formation des biofilms a longtemps été considérée comme limitée aux étapes initiales, y compris le transport de masse et l'adhésion réversible. Des modèles de transport de masse ont été proposés en supposant que les bactéries étaient similaires à des particules colloïdales inertes et ont été validés ou invalidés dans divers systèmes de déplacement d'écoulement (Li *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2014). Cependant, la diversité des bactéries et la complexité des surfaces cellulaires bactériennes ont empêché le développement d'un modèle physico-chimique généralisé pour l'adhésion des bactéries aux surfaces qui reste à ce jour dépendante de l'espèce étudiée.

Pour les pathogènes humains *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus*, l'étape initiale de la formation d'un biofilm est l'attachement à des protéines de la matrice humaine, telles que la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine, etc. (Otto, 2008). O'Toole et Kolter ont démontré que les mutants déficients en flagelles de *P. aeruginosa* ne pouvaient pas adhérer sur les surfaces et former de micro-colonies (O'Toole & Kolter, 1998). La capacité de motilité des cellules bactériennes est donc un élément clé de la première étape d'adhésion réversible. Les flagelles se détachent lorsque les cellules se fixent de façon définitive et deviennent matures pour former le biofilm.

La production de substances polymériques extracellulaires (EPS) sous forme de matrice débute lorsque la densité cellulaire et l'adhésion sont suffisamment fortes et les premières micro-colonies font leur apparition (figure 3). Ce phénomène est le résultat de l'expression de plusieurs gènes qui sont responsables de la production de protéines de surface comme les porines (Cohen, 2014) via un processus de communication appelé le quorum sensing (QS) qui sera décrit en détail dans la partie 4 de cette section. Les porines aident au transport des polysaccharides qui sont utilisés dans la formation de la couche d'EPS. La matrice d'EPS de *P. aeruginosa* a été bien étudiée, en raison du rôle que les biofilms de *P. aeruginosa* jouent dans de nombreuses infections (Lanter *et al.*, 2014; Høiby *et al.*, 2017). Une fois que la première couche du biofilm est établie, des cellules de la même espèce ou d'autres espèces peuvent coloniser le biofilm qui se développe à partir d'une couche mince jusqu'à former une structure tridimensionnelle. Dans un biofilm mature, les bactéries se répartissent en fonction de leur métabolisme et de leur tolérance à l'air. Ainsi, elles occupent des niches écologiques différentes au sein du biofilm. Par exemple, des bactéries peuvent adopter un métabolisme anaérobie en raison de la formation d'un gradient d'oxygène au sein du biofilm.

Les micro-organismes des communautés du biofilm sont capables de communiquer entre eux et assurent des fonctions spécialisées. Les cellules sont regroupées en communautés très diverses, dont chacune est responsable d'une tâche particulière (Rasamiravaka *et al.*, 2015). L'activité métabolique du biofilm évolue avec le changement de l'environnement proche. Au cours de la phase initiale du développement du biofilm, l'activité métabolique est élevée puis diminue progressivement au fur et à mesure de sa maturation (Rathsam *et al.*, 2005). Lorsque la population microbienne augmente, des canaux de diffusion complexes sont utilisés pour acheminer les nutriments, l'oxygène et les autres éléments nécessaires à la croissance des cellules. Les déchets métaboliques et les débris sont transportés par ces canaux. En fonction des changements environnementaux du biofilm, les activités métaboliques des cellules sont modifiées. Les micro-organismes formant un biofilm ont tendance à inclure de l'ADN étranger, ce qui peut finalement entraîner l'expression de protéines exogènes (Qayyum *et al.*, 2016). Au fur et à mesure de la maturation du biofilm, les cellules piégées sécrètent dans le biofilm davantage de molécules, tels que des protéines, de l'ADN, différents polysaccharides, etc. La maturation du biofilm est suivie de l'étape de dispersion, qui est également critique pour le cycle de vie du biofilm. Lors de cette phase, des cellules du biofilm peuvent reprendre leurs formes mobiles antérieures et quitter la structure. Les biofilms se dispersent en raison de plusieurs facteurs, tels que le manque de nutriments, une compétition intense, une population trop nombreuse, etc. La dispersion peut se produire dans l'ensemble du biofilm ou seulement dans une partie de celui-ci. La libération des cellules planctoniques favorise l'initiation de nouveaux biofilms sur d'autres sites pour déclencher un nouveau cycle.

3. Une matrice extracellulaire complexe

La matrice extracellulaire est un composant complexe et extrêmement important de tous les biofilms. Elle offre une structure architecturale et une stabilité mécanique à la population associée. Un biofilm est principalement composé d'eau (Hou *et al.*, 2018), les valeurs de la littérature oscillent autour de 95% pour des biofilms bactériens classiques. Elle peut être présente dans les capsules des cellules microbiennes ou exister en tant que solvant dont les propriétés physiques, comme la viscosité, dépendent les solutés qui y sont dissouts. La liaison et la mobilité de l'eau au sein de la matrice du biofilm font partie intégrante des processus de diffusion qui ont lieu dans le biofilm. Outre l'eau et les cellules microbiennes, la matrice du biofilm est un complexe de polymères sécrétés, de nutriments et de métabolites absorbés, de produits issus de la lyse cellulaire et même de matières particulaires et de détritrus provenant du milieu environnant immédiat (Neu & Lawrence, 2014a; Wickramasinghe *et al.*, 2020).

Le tableau 1 récapitule les proportions des principaux composants des biofilms, dont les gammes de pourcentages sont exprimées afin de refléter au mieux les valeurs rencontrées dans la littérature. Ainsi, toutes les principales classes de macromolécules, telles que les protéines, polysaccharides et les différents acides nucléiques, peuvent être présentes en plus des lipides, des phospholipides et d'autres composants cellulaires. Toutes les molécules peuvent tout de même représenter plus de 3% de la totalité du biofilm. La quantité de matériel cellulaire à l'intérieur d'un biofilm peut elle-même varier considérablement. Les valeurs pour le carbone organique total suggèrent que le matériel cellulaire pourrait représenter environ 3 à 5 % du biofilm mais cette valeur peut parfois atteindre les 15% dans des conditions de croissance bien particulières, le reste étant de nature extracellulaire (Hou *et al.*, 2018; Kassinger & Van Hoek, 2020).

Tableau 1 : Proportion des composants d'une matrice de biofilm type

Composant	Pourcentage moyen
Eau	90 – 95 %
Cellules microbiennes	3 – 5 %
Polysaccharides	2 – 5 %
Protéines et enzymes	Moins de 1 %
Matériel génétique	Moins de 1 %
Nutriments	Moins de 1 %
Particules et débris microbiens	Moins de 1 %

Les EPS sont synthétisés de façon extracellulaire ou intracellulaire (puis sécrétés dans le milieu extérieur) (Sun & Zhang, 2021). Ils servent de structure de base pour l'adhésion d'autres glucides, protéines, acides nucléiques et lipides. Les composants, les structures et les propriétés des EPS diffèrent selon leurs natures. Nelson (2013) a analysé les compositions et les liaisons de la matrice EPS des biofilms de *E. faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *P. aeruginosa*. Le mannose, le galactose et le glucose sont les glucides les plus abondants, suivis par la N-acétyl-glucosamine, l'acide galacturonique, l'arabinose, le fucose, le rhamnose et le xylose. La plupart des EPS ne sont pas spécifiques du biofilm, mais leur production augmente à la suite d'une réponse au stress, comme la production d'acide colanique chez *E. coli* (Wang *et al.*, 2020) et la synthèse d'alginate chez *P. aeruginosa* (Pournajaf *et al.*, 2018). La composition des biofilm de *P. aeruginosa* est très étudiée, car cette bactérie est associée à de nombreuses infections chroniques chez l'homme et est capable de se développer dans des conditions très variées.

Parmi les exopolysaccharides associés aux biofilms de *P. aeruginosa*, le Pel (Friedman & Kolter, 2004), le Psl (Heredia-Ponce *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2004) et les alginates (Pournajaf *et al.*, 2018) sont les plus étudiés. L'alginate protège les cellules de *P. aeruginosa* des antibiotiques tels

que la ciprofloxacine, la gentamicine et la ceftazidime (Pokharel *et al.*, 2019), et il supprime la réponse immunitaire de l'hôte (Sweere *et al.*, 2020). Le Psl et le Pel sont également deux exopolysaccharides majeurs de la matrice du biofilm et sont présents en quantité importante. Le polysaccharide Psl, composé d'un motif répétitif constitué de D-mannose, L-rhamnose et D-glucose, favorise le processus initial d'attachement à la surface. Les gènes Pel sont responsables de la formation d'exopolysaccharides riches en glucose dans la souche PA14 (Friedman & Kolter, 2004) et les gènes Psl sont impliqués dans la formation d'exopolysaccharides riches en mannose dans la souche PAO1 (Jackson *et al.*, 2004). Une souche PAO1 déficiente en Psl peut encore former un biofilm mature en régulant à la hausse les gènes Pel (Colvin *et al.*, 2012).

Plusieurs méthodes sont développées pour étudier la composition de la matrice du biofilm, mais toutes ne sont pas couronnées de succès. Par exemple, des lectines marquées par fluorescence ont été utilisées par Johnsen *et al.* (2000) comme méthode non invasive pour localiser les polymères contenant des hydrates de carbone au sein des biofilms. Cependant, la liaison des lectines n'était pas nécessairement une preuve de la présence de cibles spécifiques dans les biofilms. Elles se liaient également de manière non spécifique ou adhéraient à d'autres composants présents dans la matrice du biofilm. Néanmoins, l'identification des types de cellules spécifiques au sein de la matrice par l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) et de ses variantes s'est avérée très utile (Deng & Zhu, 2017) notamment dans le domaine de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Cette méthode a apporté de nouvelles informations sur la complexité structurelle des biofilms et a confirmé leur hétérogénéité (Møller *et al.*, 1998; Reichhardt & Parsek, 2019).

Les conclusions de ces études s'accordent toutes sur le fait que les biofilms comprennent des agrégats de cellules microbiennes au sein d'une matrice d'EPS et que des zones vides et des canaux interstitiels séparent les microcolonies. Les études indiquent que l'EPS n'est pas nécessaire pour l'attachement initial des cellules microbiennes aux surfaces et qu'il est sécrété uniquement lorsqu'une certaine densité cellulaire est atteinte (Flemming & Wingender, 2001; Pen *et al.*, 2015), mais la production d'EPS est essentielle pour le développement de l'architecture de toute matrice de biofilm (Czaczyk & Myszka, 2007; Desmond *et al.*, 2018). Les molécules d'EPS fournissent le cadre dans lequel les cellules microbiennes sont insérées. La synthèse des EPS se poursuit après la fixation des cellules et ils constituent une source de nutriments pour certaines des cellules. Lorsqu'elles sont associées à des sondes moléculaires, la distribution des espèces microbiennes individuelles au sein de la matrice peut être tracée (Møller *et al.*, 1998) et il est possible de distinguer les différents EPS au sein des biofilms mixtes à l'aide de marqueurs spécifiques de certains sucres.

4. Quorum sensing : vers un comportement communautaire

Au sein de la communauté du biofilm, les bactéries communiquent entre elles en utilisant des molécules de signalisation chimique en fonction de la densité de la population, dans un processus appelé quorum sensing (QS) (Waters & Bassler, 2005). La communication intercellulaire par QS implique la production, la libération, la détection et la réponse à de petites molécules appelées autoinducteurs (AI). Ces molécules diffusibles induisent l'expression de certains gènes en fonction de leur concentration qui reflète la densité bactérienne. Au cours de leur croissance, les bactéries produisent les AI qui activent le QS lorsque leur concentration atteint un seuil. Une grande variété de molécules de signalisation QS est connue chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Kalia *et al.*, 2014 ; Laj *et al.*, 2022 ; Li & Tian, 2012 ; Whiteley *et al.*, 2017). Un modèle généralisé englobant les composants utilisés dans le processus du QS des bactéries Gram-positives est présenté en figure 4. Deux types d'AI sont principalement présents :

- La première catégorie d'AI est représentée par les oligopeptides, principalement utilisés par les bactéries à Gram positif, dans la section A de la figure 4. Ce sont des macromolécules composées de chaînes peptidiques linéaires et/ou cycliques. Dans la figure 4A₁, un peptide précurseur spécifique (grande barre bleue) est produit. Le peptide précurseur est modifié et un complexe exportateur sécrète l'oligopeptide autoinducteur mature (losanges bleus). L'AI oligopeptidique s'accumule au fur et à mesure de la croissance des cellules. Lorsque la densité cellulaire est élevée, dans la figure 4A₂, l'AI est détecté par une protéine régulatrice. Le régulateur de réponse se lie aux promoteurs de cibles spécifiques pour moduler l'expression des gènes régulés par le quorum sensing. « P » indique que le mécanisme de transduction du signal se fait par transfert de phosphate entre les éléments régulateurs.
- Les N-acyl-homosérine lactones (AHL) sont principalement utilisées par les bactéries à Gram négatif, leur structure de base comporte une chaîne carbonée dont la nature peut varier en fonction des voies de biosynthèse empruntées, et d'une fonction amide conjuguée avec une γ -lactone appelée homosérine lactone en bout de chaîne. La figure 5 regroupe quelques exemples de molécules couramment rencontrées. Deux protéines régulatrices contrôlent le quorum sensing chez la plupart des bactéries à Gram négatif. Les protéines de type LuxI que l'on retrouve dans la figure 4B₁₋₂, sont des AI-synthases et catalysent la formation de molécules d'AHL qui traversent librement la membrane et s'accumulent à une densité cellulaire élevée (figure 4B₁). Lorsque la concentration d'AHL dépasse un seuil critique, les protéines de type LuxR se lient à leurs homologues et les complexes LuxR-AI se lient à leur tour aux promoteurs des gènes cibles et activent la transcription (figure 4B₂) (Wang *et al.*, 2021).

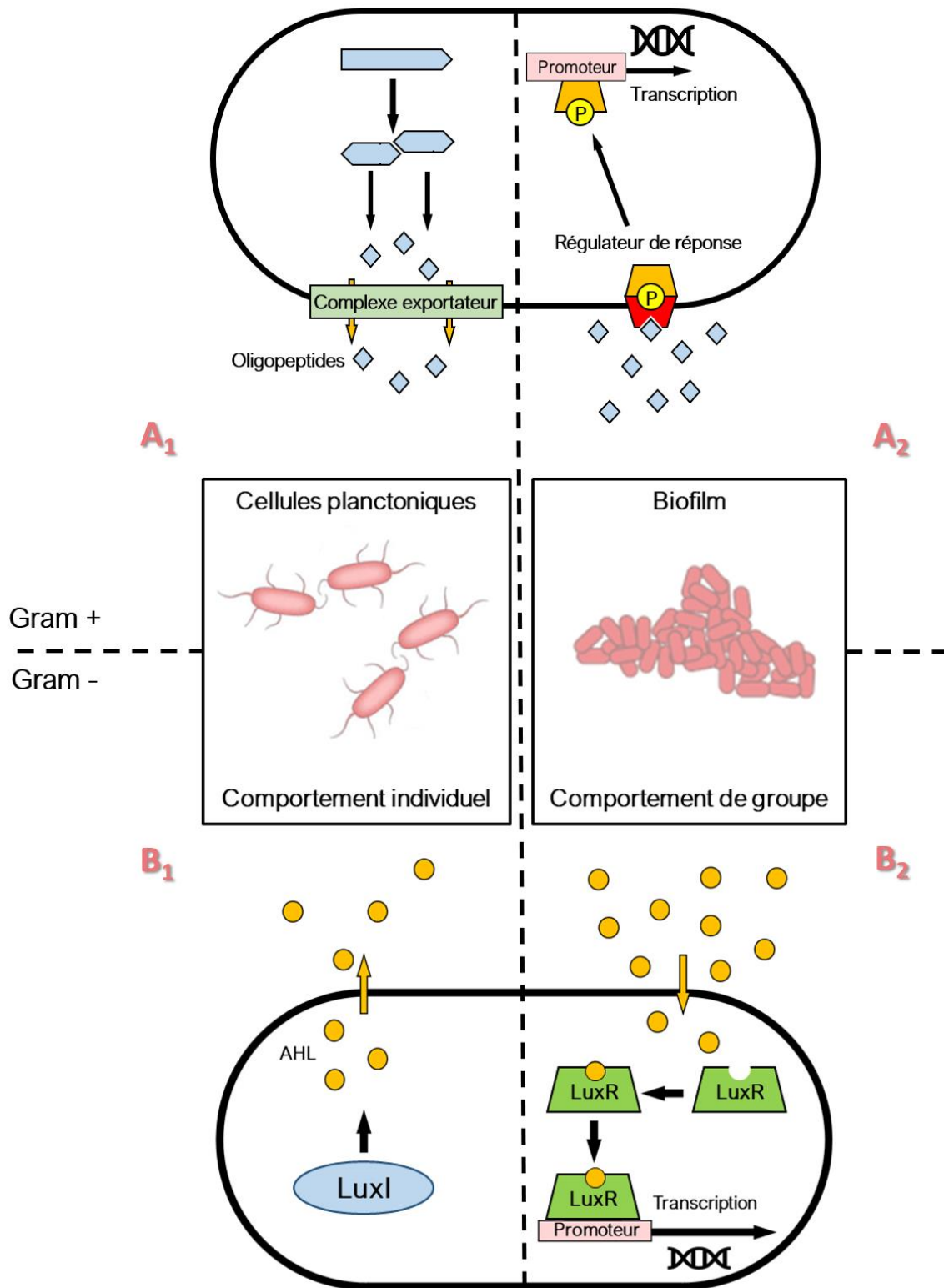


Figure 4 : Fonctionnement simplifié du quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif et positif

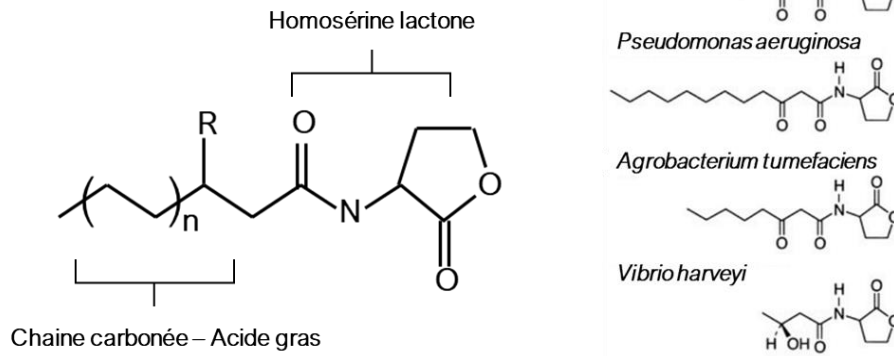


Figure 5 : Structure générale de la molécule de N-acyl-homosérine lactone accompagnée de quelques exemples de structures rencontrées chez des bactéries à Gram négatif.

De manière générale, ces signaux entraînent un large éventail d'effets sur la génétique et la physiologie bactériennes (Kalia *et al.*, 2014). Ces effets se manifestent sous la forme d'altérations des profils d'expression génétique et conduisent à la génération de phénotypes connus pour leur rôle dans le développement des biofilms, la motilité et la virulence des agents pathogènes (Kalia, 2014; Koul *et al.*, 2016). Plusieurs facteurs environnementaux, tels que le pH, la nutrition et les débits de signaux, contrôlent le fonctionnement du QS dans les biofilms (Passos da Silva *et al.*, 2017). Le QS fonctionne par un mécanisme de transmission où les molécules de signalisation se lient à leurs récepteurs sur les cellules microbiennes réceptrices et activent l'expression de plusieurs gènes, y compris les gènes responsables de la synthèse de ces molécules (Rutherford & Bassler, 2012). Le QS n'est pas limité aux bactéries, il a été identifié chez des communautés microbiennes eucaryotes et récemment chez certains virus (Whiteley *et al.*, 2017). Les mécanismes du QS sont largement étudiés chez les bactéries pathogènes, notamment *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa* et *Vibrio cholerae*.

II. DE MULTIPLES ENVIRONNEMENTS COLONISES

1. Les biofilms en milieu marin, précurseurs du biofouling

Les biofilms microbiens constituent des substrats préférentiels pour la colonisation et l'installation des spores et des larves d'organismes supérieurs, et favorisent l'apparition du biofouling. Quelques exemples d'organismes envahisseurs sont représentés figure 6 : diatomées, bactéries, spores et larves (Hellio & Yebra, 2009). Les communautés microbiennes qui se fixent initialement aux surfaces sont des déclencheurs importants des processus de biofouling (Salta *et al.*, 2013). Les biofilms eux-mêmes jouent un rôle important dans la biocorrosion des surfaces immergées dans l'eau de mer (Dang *et al.*, 2011). Le biofouling est considéré comme l'un des problèmes les plus importants auxquels est confrontée la technologie marine (Salta *et al.*, 2013; Yebra *et al.*, 2004). L'un des principaux impacts économiques du biofouling sur les infrastructures marines est la perte d'intégrité structurelle et de performance causée par l'augmentation du poids et de l'épaisseur/rugosité des dispositifs et des composants ainsi que l'obstruction des capteurs des diverses sondes immergées (optiques, électrochimiques, etc.). Les salissures marines ont également un impact non négligeable sur notre empreinte carbone en augmentant la quantité de gaz à effets de serre émis par les navires du globe.

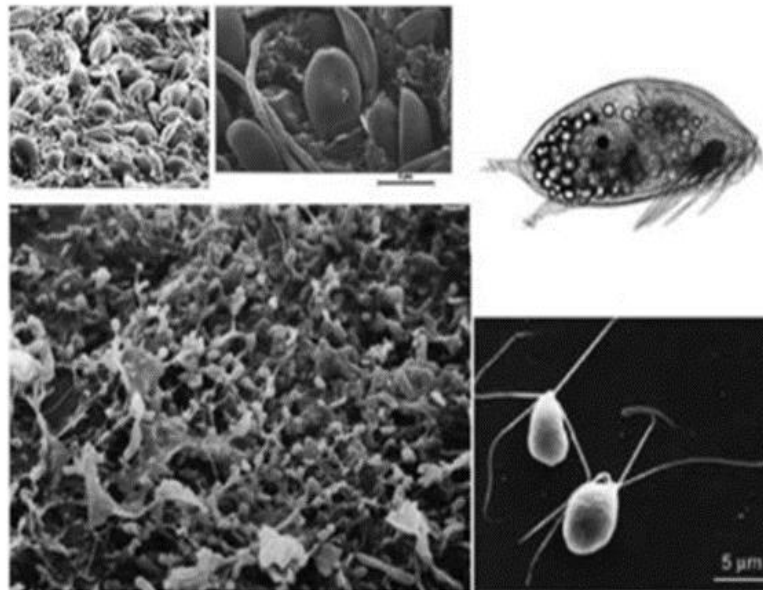


Figure 6 : Organismes envahissants comprenant des diatomées (photos en haut à gauche), des bactéries (en bas à gauche), des zoospores d'*Ulva sp.* (en bas à droite) et une larve d'*Amphibalanus amphitrite* (en haut à droite) (adapté de Hellio & Yebra, 2009).

Le biofouling est un processus complexe qui implique la colonisation par des organismes du microfouling, tels que des virus, des bactéries, des cyanobactéries, des champignons, des protozoaires et des microalgues, et par des organismes supérieurs du macrofouling (macroinvertébrés et macroalgues) (Ferrario *et al.*, 2020). Le processus de colonisation est généralement décrit comme une succession de quatre étapes principales (Bannister *et al.*, 2019; Ferrario *et al.*, 2020; Lacoste & Gaertner-Mazouni, 2015) :

- Dans les premières minutes à quelques heures suivant l'immersion, les substrats sont soumis à un conditionnement biochimique, provoqué par l'adsorption de matières organiques et des polysaccharides naturellement dissouts dans l'eau de mer.
- En quelques heures, des assemblages d'organismes unicellulaires qui sécrètent des substances polymériques extracellulaires adhèrent aux substrats. Ces biofilms microbiens facilitent l'installation des macro-organismes.
- En l'espace de quelques jours à quelques semaines (selon les saisons et zones géographiques), des colonisateurs secondaires se développent et recouvrent les premiers biofilms. Au fur et à mesure de leur croissance et de leur vieillissement, ces structures fournissent des microhabitats qui attirent d'autres espèces.
- En quelques semaines ou quelques mois, les substrats sont encrassés par des colonisateurs tertiaires. Les communautés atteignent leur maturité en quelques années, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la diversité et de la richesse des espèces.

Bien que ce modèle classique puisse représenter les principaux schémas de développement du biofouling, il simplifie le processus de colonisation en impliquant une causalité d'un stade à l'autre. Il est désormais largement admis que la colonisation suit un modèle plus dynamique et probabiliste, dans lequel l'absence d'un stade n'empêche pas l'apparition d'un autre stade. Par exemple, certaines espèces de balanes et de bryozoaires peuvent s'installer sur un substrat sans la présence d'un biofilm de conditionnement (Bazaka *et al.*, 2012; Caruso, 2020). La colonisation dépend donc fortement du type et du nombre d'organismes, dont l'installation est indépendante les uns des autres (Mora-Gómez *et al.*, 2016).

2. Les biofilms en santé humaine

Les biofilms sont présents naturellement au sein du corps humain. La plupart d'entre eux ont d'ailleurs un rôle positif sur les fonctions de nos organes et sont essentiels à la santé humaine. Néanmoins, les conditions physico-chimiques rencontrées dans le corps humain sont très favorables à la colonisation de micro-organismes externes. Habituellement éliminés par le système immunitaire, leur présence sous forme de biofilm peut engendrer des maladies parfois difficiles à traiter (Hall *et al.*, 2014). Selon l'Institut National de la Santé, plus de 80 % de toutes les infections microbiennes ont un lien avec les biofilms (Jamal *et al.*, 2018). Ces types d'infections sont difficiles à diagnostiquer et à traiter. Dans cette partie, la littérature scientifique a été passée en revue sur un certain nombre de maladies dans les différents systèmes de l'organisme liées aux biofilms (Tableau 2). L'accent est mis sur les zones les plus touchées où les pathologies répandues et où les recherches se sont spécifiquement focalisées sur la présence d'un biofilm.

Epiderme

La plupart des plaies qui contiennent des micro-organismes guérissent rapidement grâce à la réponse du système immunitaire face aux pathogènes externes. Cependant, il arrive que les plaies chroniques et aiguës soient susceptibles d'être infectées en raison de la perte de la fonction de barrière innée de la peau (Percival *et al.*, 2012). Elles peuvent être colonisées par plusieurs espèces bactériennes différentes, *S. aureus* étant le plus souvent isolé (Brackman *et al.*, 2013). Les bactéries aérobies, comme *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa*, se trouvent souvent à la surface de l'épiderme, tandis que les espèces anaérobies prédominent dans les tissus plus profonds (James *et al.*, 2008).

Système auditif interne

Parmi les différentes pathologies du système auditif, l'otite est l'une des pathologies les plus fréquemment rencontrées. La bactérie couramment rencontrée dans la colonisation du pharynx associé aux otites est *Haemophilus influenzae* (Faden *et al.*, 1997). D'autres études ont apporté des preuves que les bactéries faisaient partie de la pathogenèse notamment par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui a permis de mettre en évidence de l'ADN bactérien en l'absence de cultures positives (Ngo *et al.*, 2016; Sawada *et al.*, 2019). Des recherches ultérieures ont permis de découvrir la présence de biofilms dans l'oreille, tant chez l'homme que chez les modèles animaux.

Système digestif

Les organes intestinaux contiennent une diversité bactérienne très dense. Les micro-organismes externes qui résistent, entre autres, à la barrière stomacale peuvent perturber la flore intestinale et provoquer des pathologies de gravité diverses. Les plus étudiées sont les colites ulcéreuses et maladie de Crohn qui se caractérisent par une inflammation chronique du tube digestif. Ces maladies ont été associées à l'apparition de biofilms adhérant à l'épithélium intestinal, essentiellement dominés par *B. fragilis* (Swidsinski *et al.*, 2005) et *Enterobacteriaceae Spp.* (Swidsinski *et al.*, 2009), qui entraînent la stimulation d'une réponse inflammatoire (Swidsinski *et al.*, 2009).

Système respiratoire

La mucoviscidose est certainement la pathologie la plus étudiée dans la littérature médicale. Elle entraîne la formation de mucus épais dans les poumons qui bloque les voies respiratoires et rend la respiration difficile pour les patients (Høiby *et al.*, 2017). Quatre-vingt pour cent des patients atteints de mucoviscidose sont infectés de manière chronique par *P. aeruginosa*. Le traitement antibiotique soulage souvent les symptômes de l'infection mais les biofilms de *P. aeruginosa* agissent comme des réservoirs pour la récurrence de la maladie et la protègent des biocides (Brindhadevi *et al.*, 2020). De plus, les composants des biofilms, tels que l'alginate, principal polysaccharide de la matrice de *P. aeruginosa*, sont des facteurs de virulence. Il peut, par exemple, provoquer des lésions pulmonaires (Al Ahmar, 2019).

De manière générale, l'un des principaux obstacles au traitement des infections liées aux biofilms est l'inefficacité des antibiotiques existants en raison des couches protectrices construites par les cellules du biofilm. La pénétration des antibiotiques est donc limitée, de sorte que la communauté de cellules sédentaires persiste même en présence d'antibiotiques efficaces contre leurs homologues mobiles. La dispersion des biofilms matures peut nécessiter avant tout la perturbation de la matrice EPS. Les composants de la matrice EPS tels que l'alginate, Pel et Psl dans les biofilms de *P. aeruginosa* pourraient donc être des cibles essentielles dans la perturbation de la structure du biofilm. Les cellules étant exposées, le composé médicamenteux peut alors présenter une activité bactéricide ou agir en dispersant les cellules. D'autre part, la formation de nouveaux biofilms pourrait être inhibée en empêchant les processus initiaux comme l'attachement des cellules aux surfaces.

Tableau 2 : Maladies associées aux biofilms dans différents systèmes corporels et leurs organes affectés.

Système	Organes affectés	Maladies	Bactéries associées	Références
Auditif	Tympan	Otite	<i>H. influenzae</i>	(Faden <i>et al.</i> , 1997)
Cardiovasculaire	Artères	Sclérose artérielle	<i>Pseudomonas</i> spp.	(Lanter <i>et al.</i> , 2014)
	Valves cardiaques	Endocardite infectieuse	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	(Costerton <i>et al.</i> , 1999)
Digestif	Glandes salivaires	Sialolithase	<i>Streptococcus</i> spp.	(Perez-Tanoira <i>et al.</i> , 2019)
	Vésicule biliaire	Fièvre typhoïde, infections hépatobiliaires	<i>S. enterica</i>	(Crum, 2003)
	Intestins	Inflammation de l'intestin	<i>Enterobacteriaceae</i> spp. <i>Bacteroides fragilis</i> <i>E. coli</i>	(Swidsinski <i>et al.</i> , 2009) (Swidsinski <i>et al.</i> , 2005) (Martin <i>et al.</i> , 2004)
Epidermique	Peau et tissu sous-jacent	Infection des plaies	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>P. aeruginosa</i>	(Percival <i>et al.</i> , 2012) (Brackman <i>et al.</i> , 2013) (James <i>et al.</i> , 2008)
	Paroi vaginale	Vaginose bactérienne	<i>Gardnerella vaginalis</i>	(Machado <i>et al.</i> , 2016)
Reproductif	Utérus	Endométriose	<i>Proteus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>G. vaginalis</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Cicinelli <i>et al.</i> , 2009) (Ferris <i>et al.</i> , 2017) (Moreno & Franasiaak, 2017) (Mitchell <i>et al.</i> , 2015)
	Glande mammaires	Mastite	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	(Hensen <i>et al.</i> , 2000)

Tableau 2 : Suite

Respiratoire	Cavité nasale	Rhinosinusite	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	(Maina <i>et al.</i> , 2018) (Kadioglu <i>et al.</i> , 2008)
	Gorge, pharynx et larynx	Pharyngite, Laryngite	<i>Streptococcus</i> spp. <i>S. aureus</i>	(E Zautner, 2012)
	Poumons	Mucoviscidose	<i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i> <i>S. aureus</i>	(Høiby <i>et al.</i> , 2017)
Urinaire	Prostate	Prostatite bactérienne	<i>Klebsiella</i> spp. <i>E. coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. faecalis</i>	(Yoon <i>et al.</i> , 2012) (Weidner <i>et al.</i> , 1991)
	Vessie	Infections urinaires	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	(Rosen <i>et al.</i> , 2007)

3. Renforcement de la résilience bactérienne par les traitements traditionnels

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries constituent les problèmes de santé et écologiques les plus importants au niveau mondial (Cepas *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). La résistance aux antibiotiques est l'une des conséquences des biofilms bactériens qui contribuent aux infections chroniques (Cepas *et al.*, 2019). Il a été prouvé que la formation de biofilms est un moyen pour une bactérie de résister aux influences environnementales hostiles telles que les antibiotiques et les agents antimicrobiens (Høiby *et al.*, 2010; Navon-Venezia *et al.*, 2017). Le biofilm est récalcitrant à l'antibiothérapie et constitue une cause majeure d'infections persistantes et récurrentes par des pathogènes cliniquement importants dans le monde entier (Verderosa *et al.*, 2019). En effet, la formation de biofilms et la position des cellules bactériennes dans une matrice complexe peuvent renforcer la résistance aux antimicrobiens et aux agents stérilisants, ce qui rend ces organismes difficiles à éradiquer et à contrôler (Khatoon *et al.*, 2018; Lajhar *et al.*, 2018). La matrice d'EPS protège les bactéries des antibiotiques, évitant la pénétration des médicaments à des concentrations bactéricides (Pinto *et al.*, 2020).

De plus, les surfaces immergées telles que les coques de navire, les jetées et les plateformes marines sont constamment exposées à l'environnement marin et doivent donc être protégées contre la colonisation microbienne initiant l'apparition de salissures marines. L'écosystème marin peut être considéré comme un grand réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques, principalement acquis par la contamination d'origine humaine des eaux. Bien que la surveillance des écosystèmes marins augmente chaque année, les solutions apportées contre la résilience microbienne font largement défaut. L'une des principales raisons de cette lacune est certainement due aux exigences de croissance spécifiques des micro-organismes et au manque de méthodes de tests de sensibilité aux antimicrobiens et de critères d'interprétation standardisés. Par conséquent, les méthodes moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR), le séquençage du génome des bactéries isolées ou les approches métagénomiques sont aujourd'hui privilégiées.

Dans les environnements immergés, les processus d'encrassement biologique débutent par la formation d'un biofilm, puis l'installation d'autres organismes sessiles (Salta *et al.*, 2013). Afin de retarder ou d'inhiber la formation de biofilms et d'éviter l'utilisation d'antibiotiques généralisée, les surfaces sont maintenant traitées avec des peintures contenant des substances toxiques telles que le cuivre, le zinc, le plomb ou d'autres biocides. Ces composés sont très efficaces pour le contrôle du biofouling, mais leur mode d'action est basé sur la toxicité (Soroldoni *et al.*, 2017). C'est pourquoi il est actuellement important de développer des solutions respectueuses de l'environnement pour lutter contre les salissures biologiques. D'importants efforts sont déployés pour la recherche d'agents antisalissures naturels issus de la faune et la flore marine. C'est l'une des meilleures approches alternatives possibles pour remplacer les biocides actuels dans les peintures (Tian *et al.*, 2021). Parmi elles, des surfaces incorporant des substances naturelles isolées d'organismes vivants telles que des peptides antimicrobiens, des enzymes bactériolytiques et des métabolites secondaires ont été proposées (Hellio *et al.*, 2015; Sánchez-Lozano *et al.*, 2019). Des études sur le contrôle du biofouling à l'aide de surfaces texturées et biomimétiques ont également fait leurs preuves en tant que technologies antifouling (Sánchez-Lozano *et al.*, 2019).

D'une manière générale, les micro-organismes présents dans un biofilm sont significativement plus résistants aux antibiotiques que leurs congénères planctoniques (Myszka & Czaczyk, 2011; Rabin *et al.*, 2015a). Par exemple, les biofilms peuvent tolérer des agents antimicrobiens à des concentrations 10 à 1000 fois supérieures à celles nécessaires pour inactiver des bactéries planctoniques génétiquement équivalentes (Myszka & Czaczyk, 2011). La nature de la structure des biofilms aide les micro-organismes à résister aux agents antimicrobiens (Donlan & Costerton, 2002). La résistance aux antibiotiques est distincte et différente des mécanismes de résistance naturelle ou innée (Stewart & Costerton, 2001). Des résultats similaires ont révélé que les bactéries du biofilm développent différentes stratégies moléculaires pour protéger leurs cellules de conditions hostiles, telles que l'interaction de la matrice du biofilm avec des antibiotiques qui peuvent retarder ou réduire leurs activités, des taux de croissance lents dans lesquels les antibiotiques ne seront pas efficaces, une résistance liée à la génétique et la production de cellules persistantes qui sont tolérantes à différents antibiotiques (Pinto *et al.*, 2020). Chez les bactéries formant des biofilms, il existe un taux élevé de mutation qui leur permet de développer des mécanismes de résistance, ce qui, à son tour, donne la possibilité à leurs gènes de produire des enzymes qui inactivent les antibiotiques ou expulsent les antibiotiques à l'aide de pompes à efflux (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Dzianach *et al.*, 2019).

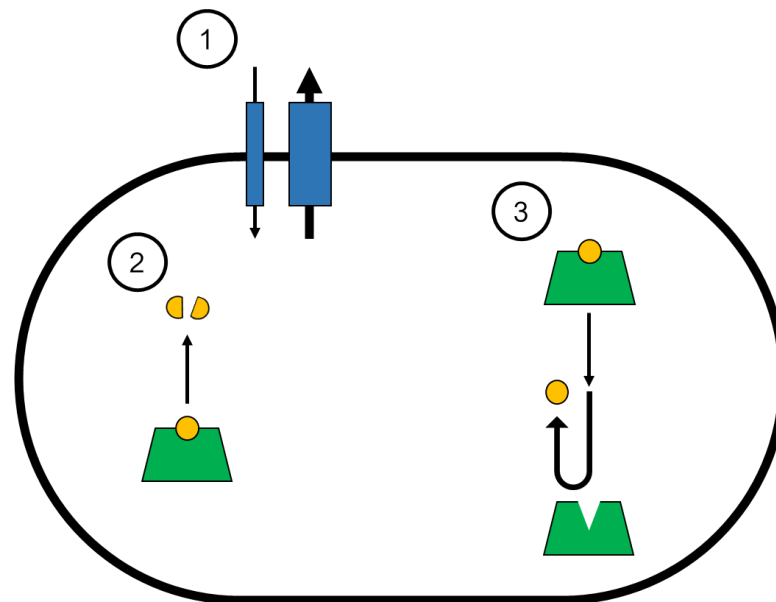


Figure 7 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. 1. Régulation des pompes à efflux, 2. Inactivation par hydrolyse, 3. Altération des récepteurs.

La résistance des bactéries aux antibiotiques dépend de différents facteurs tels que des facteurs physiques, physiologiques et génétiques (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019). Trois principales voies de défense sont empruntées par les bactéries pour faire face aux molécules biocides (figure 7) :

- La prévention de l'accès des antibiotiques à leurs cibles résulte d'une régulation de l'efflux des antibiotiques à travers les membranes biologiques (Figure 7, mécanisme n°1) (Li *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* est un pathogène, présent en milieu marin, qui utilise beaucoup ce mécanisme de résistance aux antibiotiques. Ce système permet d'évacuer les molécules létales en dehors de la structure membranaire.
- L'inactivation enzymatique des antibiotiques par hydrolyse est un mécanisme majeur de résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques naturels (figure 7, mécanisme n°2). Les isolats cliniques résistants aux antibiotiques héritent dans la plupart des cas des gènes de résistance aux antibiotiques probablement à partir d'un ensemble de gènes de résistance d'autres genres microbiens, transmis via le QS intercellulaire (Uruén *et al.*, 2020).
- Contrairement à l'inactivation enzymatique des antibiotiques naturels, aucune enzyme bactérienne n'est capable d'hydrolyser les antibiotiques synthétiques tels que les sulfamides, le triméthoprim et les quinolones (Ciofu et Tolker-Nielsen, 2019). Un mécanisme de défense alternatif permet l'altération de la cible des antibiotiques par l'acquisition de nouveaux gènes entraînant une modification enzymatique de la cible qui ne se liera plus aux antibiotiques (figure 7, mécanisme n°3).

Les micro-organismes présents dans le biofilm produisent des cellules persistantes qui sont métaboliquement inertes ayant la capacité de survivre à de fortes concentrations d'antibiotiques (Wood *et al.*, 2013). Au sein d'une population bactérienne très dense, un transfert horizontal efficace des gènes de résistance et de virulence a lieu. Le nombre de micro-organismes au sein de la matrice est tel que des échanges de gènes de résistance au travers de la communauté entière sont permis (Balcázar *et al.*, 2015). Par conséquent, la diversification génétique des micro-organismes dans le biofilm est en grande partie responsable de la résistance aux antibiotiques (Plusa, 2019). Ainsi, cette nature multifactorielle du développement du biofilm et de la tolérance aux méthodes antibiofilm employées impose de grands défis pour l'utilisation des antimicrobiens conventionnels (Koo *et al.*, 2017). L'impact environnemental des stratégies de lutte contre le biofouling est également une source de préoccupation. Il a été démontré que les peintures antifouling alternatives à base de biocides s'accumulent dans les eaux côtières et constituent des menaces pour l'environnement marin (Dafforn *et al.*, 2011). C'est pourquoi, au cours des dernières années, une grande attention a été accordée à l'utilisation d'antifouling inoffensifs pour l'environnement, dont certains composés proviennent d'organismes marins (Adnan *et al.*, 2018).

4. Des alternatives prometteuses

4.1. Le quorum quenching : une stratégie efficace

L'émergence de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique a conduit à rechercher et développer des solutions pour inhiber directement la formation d'un biofilm, aux stades précoces. La régulation du QS, aussi appelée le quorum quenching (QQ), a été une cible pour l'identification et la génération de composés anti-biofilms (Kalia, 2013; Li & Tian, 2012; Whiteley *et al.*, 2017). Le QQ désigne tous les processus impliqués dans la perturbation du QS. Les acteurs moléculaires du QQ sont divers en termes de nature (enzymes, composés chimiques), de mode d'action (clivage du signal QS, inhibition compétitive, etc.) et de cibles. Toutes les étapes principales de la voie du QS que sont la synthèse, la diffusion, l'accumulation et la perception des signaux QS peuvent être affectées. Dans certains cas, la perturbation des biofilms peut nécessiter des stratégies mécaniques, physiques et chimiques (Satpathy *et al.*, 2016). Les inhibiteurs d'adhésion, les perturbateurs d'EPS et les micro-organismes compétitifs sont quelques-uns des moyens couramment utilisés pour éradiquer les biofilms microbiens (Roy *et al.*, 2018). Les substances chimiques naturelles ou synthétiques dirigées contre le QS sont connues sous le nom d'inhibiteurs de détection du quorum (QSI) (Abraham, 2016; Kalia *et al.*, 2011).

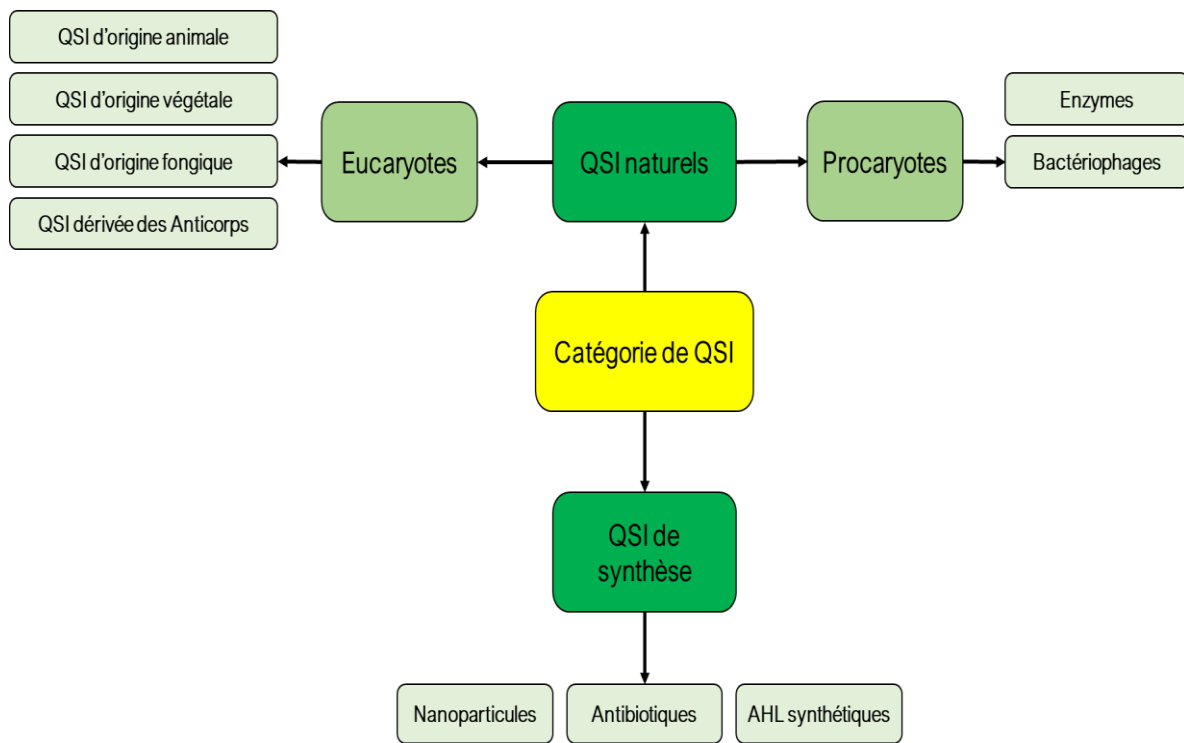


Figure 8 : Diagramme représentant les deux principales familles d'inhibiteurs du quorum sensing.

Les QSI sont divisés en deux catégories (figure 8). La première catégorie comprend les molécules de synthèses, produites en laboratoire. Parmi elles, des analogues synthétiques des molécules du QS tels que les analogues d'AHL, de lactone (Kalia, 2013) ainsi que les substances antibiofilm synthétiques et des antibiotiques représentent la majeure partie des moyens utilisés pour inhiber la croissance du biofilm.

La seconde catégorie est représentée par les substances naturelles composées d'un panel de molécules quasiment infini. Un grand nombre d'entre elles, issues de la faune, la flore et du microbiote marin ont une activité antibiofilm. Les enzymes qui dégradent les AI en les modifiant chimiquement, par exemple les lactonases, les amidases, les réductases et les cytochromes oxydases que l'on trouve chez les bactéries, les archées et plusieurs autres micro-organismes sont employées dans certains cas (Rabin *et al.*, 2015a). De nombreux dérivés phénoliques (tanins, flavonoïdes, phénylpropène, etc.), dérivés indoliques, des alcaloïdes, des furanones, des lactones, des composés organosoufrés et des acétaldéhydes (Grandclément *et al.*, 2016; Rabin *et al.*, 2015b) composent également cette catégorie.

4.2. La phagothérapie

4.2.1. Avantages et inconvénients

L'utilisation des virus de bactéries, les bactériophages (phages), comme agents thérapeutiques pour traiter les infections bactériennes a débuté bien avant la première utilisation clinique d'un médicament antibiotique. Cependant, l'introduction d'antibiotiques à large spectre dans les années 1940 a rapidement pris le pas sur le développement de la thérapie par les phages dans une grande partie du monde. L'émergence de multirésistances aux antibiotiques, combinée au ralentissement du développement de nouvelles molécules candidates au cours des dernières décennies (World Health Organization, 2019) menace de réduire encore davantage les options de traitement des biofilms auparavant curables.

Les phages sont les entités biologiques les plus abondantes sur terre, avec plus de 10^{30} virions individuels estimés sur la planète (Hendrix, 2002), et une taxonomie bien décrite, toujours en cours de développement (Clokic *et al.*, 2011; Grose & Casjens, 2014). Cette vaste abondance et cette diversité de phages dans la nature constituent une ressource prête à être exploitée pour la sélection de phages à des fins diverses, notamment la thérapie antibactérienne. L'utilisation des phages en tant que stratégie thérapeutique antibactérienne présente un certain nombre d'avantages potentiels, comme l'ont montré de nombreuses études (Anand *et al.*, 2022; Burrowes *et al.*, 2011; Kortright *et al.*, 2019; Loc-Carrillo & Abedon, 2011; Monteiro *et al.*, 2019) :

- Les phages ont des mécanismes de destruction des bactéries entièrement différents de ceux des antibiotiques et peuvent donc souvent être utilisés en synergie avec des agents biocides.
- Un phage ne peut généralement infecter qu'une seule espèce bactérienne (ou un sous-groupe au sein d'une espèce bactérienne) augmentant la spécificité des traitements phagiques ; ils ont ainsi peu d'impact sur la microflore classique (contrairement aux antibiotiques à large spectre).
- Les phages se répliquent dans la bactérie cible, ils s'accumulent directement sur le site d'action pour éliminer les cellules pathogènes.
- Les phages sont omniprésents dans l'environnement et généralement faciles à isoler, la sélection d'un nouveau phage actif contre une souche bactérienne résistante est relativement simple et rapide.
- Des phages ayant des spécificités différentes peuvent être combinés dans des mélanges dits « cocktails de phages » afin de traiter cibler plusieurs bactéries pathogènes et lutter contre l'émergence de contre-mesures bactériennes.

- Les phages évoluent avec leurs hôtes et peuvent s'adapter aux nouvelles souches résistantes de la bactérie hôte.

Malgré les nombreux avantages de la thérapie phagique par rapport aux traitements antibiotiques, la nature des bactériophages engendre quelques freins à leur utilisation généralisée. Parmi ces limites, les plus contraignantes sont l'étroitesse du spectre de la gamme d'hôtes de nombreux phages (qui signifie qu'un seul phage ne peut pas être utilisé pour traiter la diversité au sein d'un pathogène bactérien), différents mélanges de phages peuvent être nécessaires pour traiter la même infection bactérienne dans plusieurs régions géographiques et la collecte, le maintien ainsi que l'utilisation de grandes banques de phages divers peuvent rendre plus difficile et plus coûteux le développement de traitements phagiques si l'on suit un modèle de production centralisé hérité de l'ère de l'antibiothérapie (Anand *et al.*, 2022; Burrowes *et al.*, 2011; Kortright *et al.*, 2019; Loc-Carrillo & Abedon, 2011; Monteiro *et al.*, 2019).

4.2.2. Biologie des bactériophages

Les bactériophages sont des entités biologiques qui détournent la machinerie cellulaire de leurs hôtes pour accomplir leur cycle de réplication. Les phages sont intimement liés aux caractéristiques écophysiologiques de leurs hôtes. De ce fait, ils ont développé différentes stratégies au cours de leur évolution afin de maintenir un équilibre dynamique hôte/virus nécessaire à leur survie. Ils infectent leur hôte via quatre voies distinctes (Lelchat, 2020) :

- Le cycle lytique (figure 10) : le phage injecte son matériel génétique afin de détourner le métabolisme de l'hôte pour former de nouveaux phages, détruisant la cellule dans le procédé.
- Infection chronique : Le virus se réplique à l'intérieur de la cellule hôte comme pour le cycle lytique, mais ne détruit pas la cellule. Les nouveaux virions sont extrudés par bourgeonnement sur la paroi cellulaire.
- Etat porteur : le phage reste en dormance dans le cytoplasme cellulaire.
- Cycle lysogénique (figure 10) : Après injection du matériel génétique, l'ADN du phage sera répliqué pendant la mitose cellulaire.

Leur classification taxonomique par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) est basée sur le type d'hôte infecté. Ainsi, la figure 9 représente quelques exemples de virus classés selon cette règle.

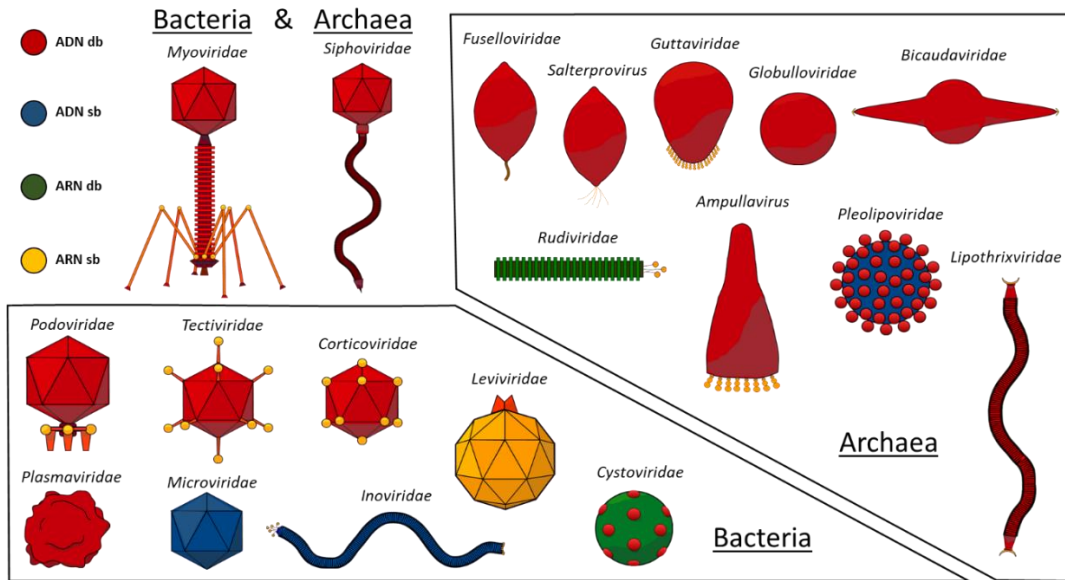


Figure 9 : Classification de plusieurs bactériophages selon leur type d'hôte et leur matériel génétique (Lelchat, 2020).

Pour initier un nouveau cycle viral, les phages doivent atteindre leurs hôtes et s'adsorber à leur surface (figure 10, étape 1). Cette adsorption se fait au niveau d'un récepteur cellulaire bien spécifique caractéristique d'un couple virion/hôte bien déterminé. Cette capacité à infecter un seul hôte, ou plusieurs (espèces ou genres), est appelée le spectre d'hôte et représente souvent un critère de choix dans la valorisation biotechnologique d'un phage (Ross *et al.*, 2016). Les récepteurs cellulaires auxquels sont sensibles les phages sont assez variés, allant du motif peptidique à l'oligosaccharide et parfois une combinaison des deux (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). La localisation peut-être directement sur la paroi cellulaire, dans la capsule polysaccharidique, les *pili* ou les flagelles.

La lysogénie des phages est un autre domaine dans lequel l'application de nouvelles techniques a récemment permis d'obtenir des informations essentielles. La lysogénie est un cycle de vie alternatif très commun que les phages tempérés peuvent employer, où au lieu de se répliquer et de lyser leur hôte, ils deviennent latents en s'intégrant dans le génome de leur hôte comme indiqué dans la figure 10 à l'étape 3b. Les génomes de ces phages sont ensuite répliqués avec le génome de l'hôte (figure 10, étape 4b) et peuvent éventuellement initier leur cycle lytique (figure 10, étape 5) sur des signaux spécifiques qui impliquent généralement un stress de l'hôte (Howard-Varona *et al.*, 2017) ou l'aide d'un phage lytique (helper phage) dans le cas des phages satellites. Les phages tempérés affectent les communautés bactériennes à de multiples niveaux : ils transfèrent de nouveaux gènes à leurs hôtes, modifient l'expression des gènes de l'hôte, offrent une protection contre l'infection par d'autres phages et tuent les populations hôtes par induction (Howard-Varona *et al.*, 2017).

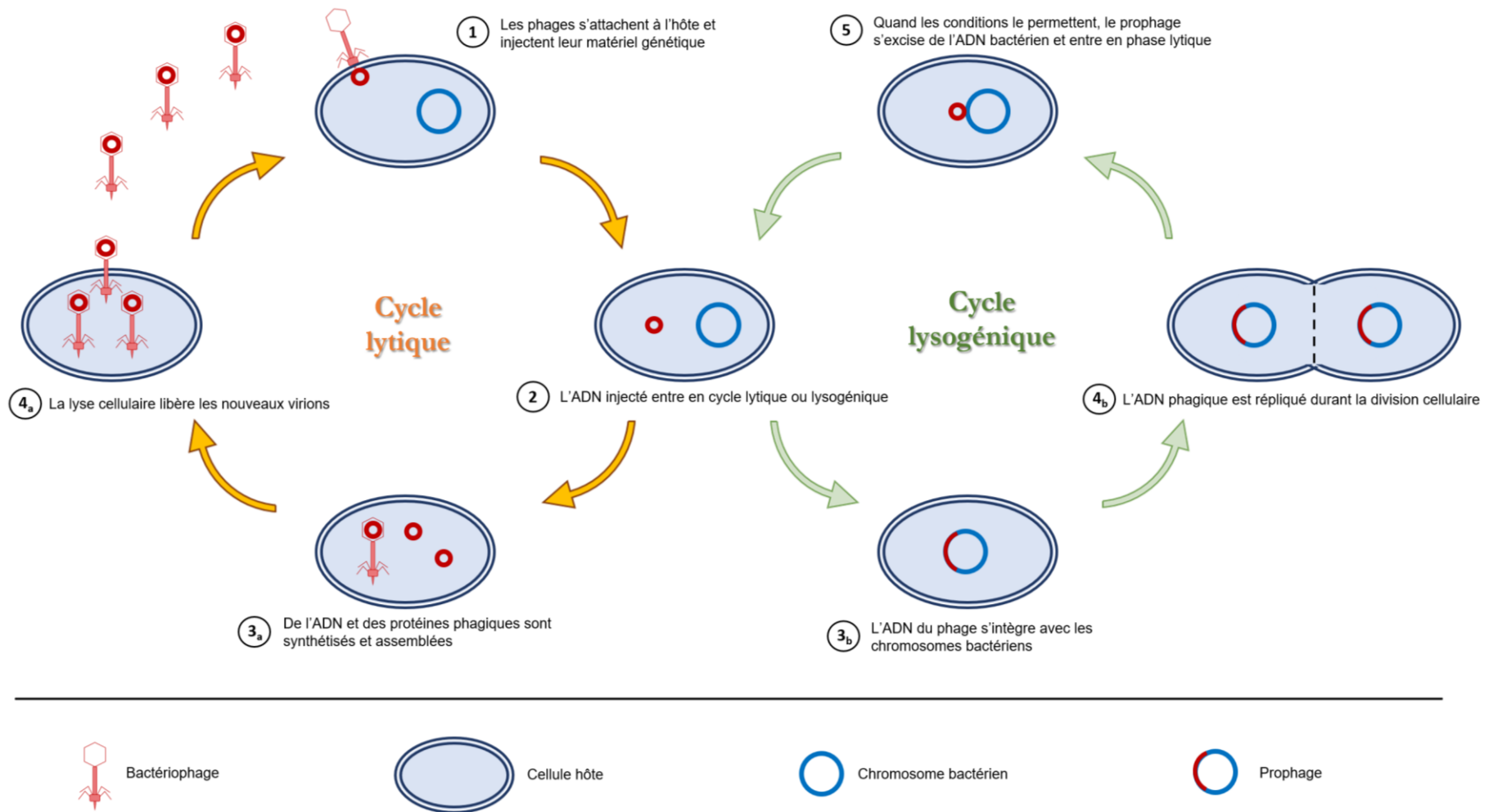


Figure 10 : Schéma représentant les deux principales voies d'infection et de répllication des bactériophages.

Chaque fois qu'un phage infecte une cellule bactérienne, il peut soit exécuter le cycle lytique, soit devenir un prophage (cycle lysogénique). Dans le cas du phage lambda d'*E. coli*, il a été démontré qu'il s'agissait d'un processus complexe impliquant un réseau de répresseurs et d'activateurs de transcription. Ainsi, le réseau intègre des informations sur l'état métabolique de la cellule et la multiplicité du phage pour prendre la décision finale (Oppenheim *et al.*, 2005). De nouvelles études ont examiné ce processus en utilisant des techniques unicellulaires et ont maintenant montré que ce choix de réplication peut être expliqué par des « décisions » au niveau cellulaire ou subcellulaire (Golding, 2016 ; Trinh *et al.*, 2017). Dans ces études, les marqueurs fluorescents permettent la visualisation de phages uniques infectant des cellules uniques et rendent compte de la décision individuelle de lyse/lysogénie prise par chaque phage.

4.2.3. Adaptation des systèmes de défense bactériens

Les phages ont évolué conjointement avec leurs hôtes procaryotiques depuis des milliards d'années, probablement dès l'apparition de Luca (Last Universal Common Ancestor). La forte pression de sélection imposée aux bactéries par les phages a entraîné l'évolution de multiples stratégies de défense bactériennes contre l'infection phagique. Les bactéries possèdent de multiples lignes de défense innées et adaptatives (Dy *et al.*, 2014), tandis que les phages ont mis au point des stratégies complexes pour surmonter ces défenses (Samson *et al.*, 2013). Les défenses bactériennes ciblent plusieurs étapes du cycle d'infection par les phages : les modifications de surface et les mutations des récepteurs empêchent l'adsorption des phages. Par exemple, les phages ϕ H20 et KVP40 affectent différemment la formation de biofilms chez l'agent pathogène *Vibrio anguillarum*. Le phage ϕ H20 a efficacement inhibé et perturbé la formation du biofilm chez *V. anguillarum* (figure 11-A,B) tandis que l'exposition au KVP40 a favorisé l'agrégation et la formation du biofilm (figure 11-C,D), piégeant les phages dans la matrice (Tan *et al.*, 2015). Si la coévolution entre les bactéries et les phages a été largement étudiée, les nouvelles découvertes qui découlent de l'étude des phages non-modèles ont dévoilé un nouvel arsenal d'outils utilisés à la fois par les phages et les bactéries dans leur stratégies adaptatives. Une condition préalable essentielle à l'infection par les phages est la reconnaissance et l'adsorption du phage sur son récepteur correspondant à la surface de la bactérie. Tant l'évolution expérimentale en laboratoire que les observations dans les environnements naturels indiquent que les mutations des récepteurs constituent une voie majeure pour acquérir une résistance contre les phages infectants (Hampton *et al.*, 2020). Les phages, quant à eux, doivent modifier leurs propres protéines de liaison au récepteur pour s'adapter au récepteur muté ou pour s'adsorber à une nouvelle cible (Hampton *et al.*, 2020). Mais des découvertes récentes (Simmons *et al.*, 2018 ; Anand *et al.*, 2022) montrent que les phages et les bactéries ne dépendent pas uniquement des mutations pour survivre.

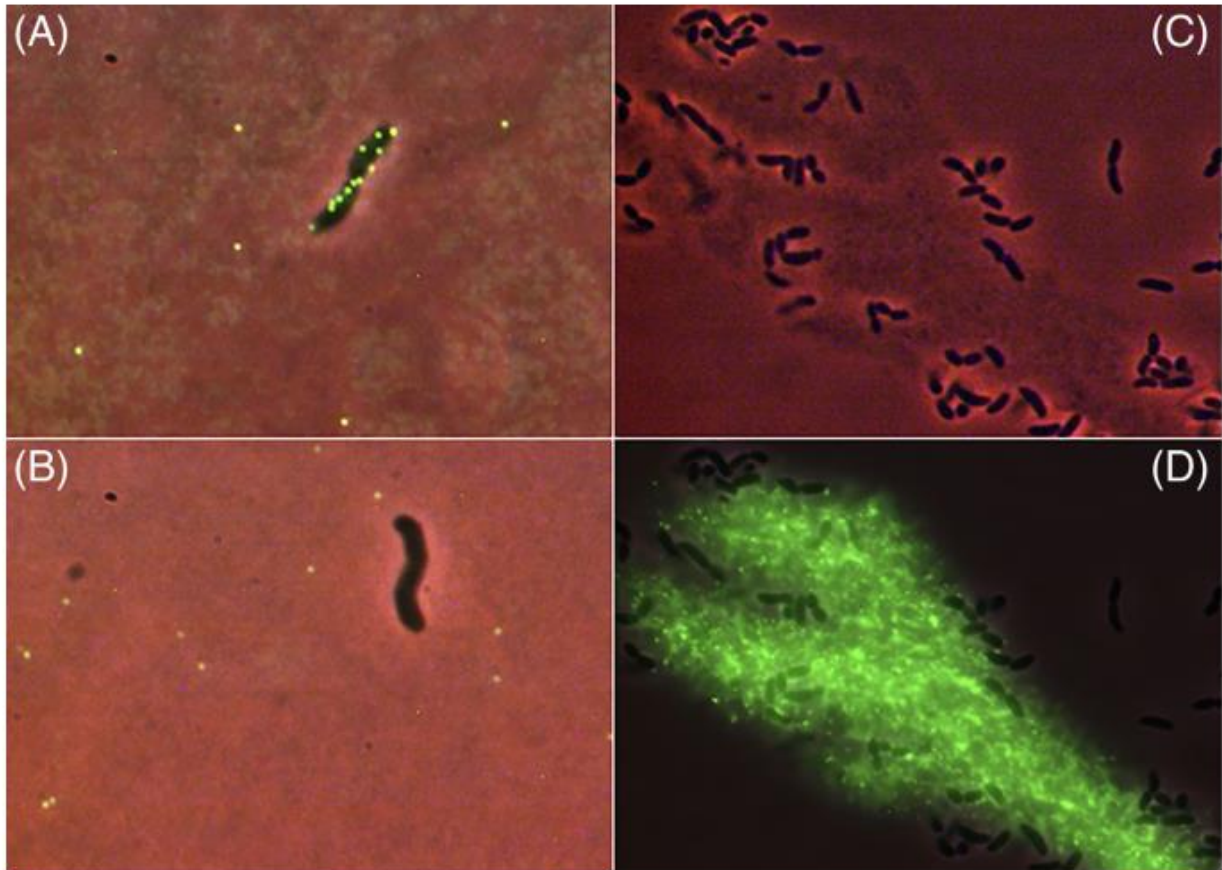


Figure 11 : Visualisation de deux réponses différentes à l'exposition aux phages de *Vibrio anguillarum*. (A) L'adsorption du phage Φ H20 observée dans les cellules ; (B) L'adsorption du phage Φ H20 n'est pas observée, indiquant une résistance dérivée de la mutation ; (C) Une sensibilité réduite aux phages KVP40 indique une tolérance médiée par le biofilm en réponse à l'exposition au phage (l'image est sans fluorescence) ; (D) Le lysat indique que les phages KVP40 ne s'adsorbent pas aux cellules, mais sont plutôt piégés dans la matrice du biofilm (adapté de Tan *et al.*, 2015).

Il semblerait que le génome propre des phages porte des systèmes ciblant d'autres phages. Des analyses d'une grande collection de phages tempérés infectant *Pseudomonas* et *Mycobacterium* ont révélé que de nombreux prophages fournissent à leur hôte une défense contre d'autres types de phages (Bondy-Denomy *et al.*, 2016 ; Montgomery *et al.*, 2019). Il a entre autres été constaté que les phages tempérés de *P. aeruginosa* manipulent fréquemment les récepteurs de l'hôte, fournissant ainsi une immunité contre d'autres phages qui dépendent de ces récepteurs (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Quant aux phages de *Mycobacterium*, ils fournissent à leur hôte une défense en portant des systèmes de restriction-modification qui protègent contre d'autres phages, ainsi que des gènes qui médient des défenses intracellulaires par des mécanismes encore peu clairs (Montgomery *et al.*, 2019).

4.2.4. A retenir sur la phagothérapie

La prévention des biofilms par les bactériophages est un domaine en plein essor dont l'utilité potentielle dans le traitement des infections bactériennes résistantes aux antibiotiques n'a pas encore été prouvée, à l'ère de la multirésistance croissante aux antibiotiques chimiques. Afin d'évaluer pleinement le potentiel des médicaments à base de phages, les résultats collectés par la communauté scientifique et la longue expérience de la thérapie par les phages dans certaines parties du monde doivent être mis à profit pour concevoir et tester de nouvelles thérapies par les phages susceptibles de répondre au mieux aux besoins médicaux de notre époque concernant les biofilms. L'exploitation de combinaisons de thérapies par les phages avec des antibiotiques chimiques semble être une voie prometteuse pour le développement clinique à court terme, tandis que la thérapie autonome par les phages se profile comme un potentiel futur à une époque où l'utilisation des antibiotiques semble une impasse thérapeutique de plus en plus fréquente. Des études approfondies sur leur mode d'action contre les pathogènes doivent persister afin de mieux comprendre les dynamiques des populations bactériennes sous l'influence des bactériophages. L'importance des traitements ciblés et les nouvelles technologies permettant de suivre leur action contre la prolifération bactérienne, par exemple à l'aide de capteurs ou de méthodes de détection des biofilms classiques, représentent une piste de plus en plus empruntée pour répondre aux problématiques actuelles.

III. LES PRINCIPALES METHODES DE DETECTION ET DE MESURE DES BIOFILMS

Les biofilms font l'objet de nombreuses études de plusieurs décennies (Yebara *et al.*, 2004). Leur perception a considérablement évolué au cours des dernières années en raison du développement et de l'adaptation des technologies à l'étude des biofilms, notamment les nouvelles technologies d'imagerie, les méthodes biochimiques et les outils de biologie moléculaire des écosystèmes. Il est désormais possible d'obtenir une vue d'ensemble de la structure tridimensionnelle du biofilm et une connaissance plus détaillée de la structure jusqu'à l'échelle nanométrique (Neu & Lawrence, 2015). La technologie liée à l'étude des biofilms a également évolué vers le développement de dispositifs de biofilms qui imitent mieux les conditions environnementales. Une connaissance plus approfondie du biofilm dans son ensemble, ainsi que de la façon dont il interagit avec le milieu environnant, contribue au développement de méthodes efficaces pour contrôler les biofilms nuisibles ou pour améliorer et moduler les biofilms bénéfiques (pour le traitement des eaux usées, la biorestauration, la production d'électricité et la biofiltration). Cela nécessite une approche multidisciplinaire assistée par des méthodes adéquates.

Les principales techniques de détection des biofilms et leurs diverses propriétés sont présentées dans cette section du manuscrit. Bien que cette synthèse exhaustive se concentre sur l'application des techniques de détection des biofilms dans un contexte général, toutes les techniques sont prises en considération. Ainsi, les résultats de cette recherche fourniront un guide technologique qui servira d'appui afin de comparer les travaux de cette thèse aux diverses techniques existantes, dont les avantages et les limites sont regroupés dans le tableau 3, à la fin de cette section.

1. Méthodes chimiques, biologiques et moléculaires

1.1. Mesure de la biomasse totale

La pesée en masse sèche, pour déterminer une masse par unité de surface ou une densité d'un biofilm, est utilisée pour quantifier rapidement la croissance du biofilm (Wilson *et al.*, 2017). Pour déterminer la masse sèche, le biofilm et son substrat de croissance sont placés dans un four à une température constante jusqu'à ce que l'eau soit retirée et qu'un poids constant soit atteint (Wilson *et al.*, 2017). Cette technique est simple à mettre en œuvre mais elle présente aussi des inconvénients, comme l'indiquent Wilson *et al.* (2017) car elle ne permet pas de distinguer les

différents composants du biofilm, tels que les EPS et éventuellement différents types de micro-organismes. Son utilisation dépend également de la résistance à la chaleur du substrat de croissance (Wilson *et al.*, 2017). De plus, l'étape de séchage peut entraîner le décollement du biofilm de la surface. Si ce phénomène se produit, les mesures de poids ne diffèrent pas mais l'échantillon se dégrade plus rapidement.

1.2. Marquage au cristal violet

Les méthodes chimiques utilisent des colorants ou des fluorochromes capables de se lier aux composants du biofilm. Ces méthodes indirectes peuvent être utilisées pour détecter des composants spécifiques du biofilm. La coloration au cristal violet (CV) pour la quantification des biofilms reste la technique de quantification la moins chère pour les essais sur plaques. D'autres fluorochromes plus spécifiques existent mais leur coût rend leur utilisation moins fréquente. Comme le montre la figure 12, ces tests colorent à la fois les cellules vivantes et mortes, ainsi que certains composants présents dans la matrice du biofilm, et sont donc bien adaptés à la quantification de la biomasse totale du biofilm (Pitts *et al.*, 2003; Shukla & Rao, 2017). Les étapes de lavage visent à éliminer les cellules non attachées et le colorant non lié. Le rinçage et le trempage impliquent le contact avec une interface air-liquide en mouvement, ce qui entraîne le détachement d'un nombre imprévisible de micro-organismes adhérents (Gómez-Suárez *et al.*, 2001). La procédure de lavage doit prendre en compte le type de biofilm, la force de l'adhérence et les différentes espèces microbiennes. Afin de limiter le détachement important de la biomasse sessile, il est recommandé d'ajouter une étape de fixation avec de l'éthanol absolu. L'étape de solubilisation permet également d'améliorer la reproductibilité du test.

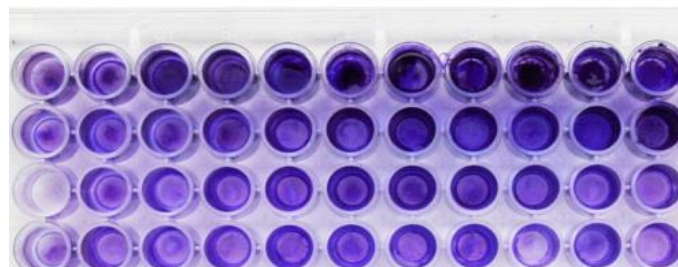


Figure 12 : Biofilm de *S. aureus* marqué au cristal violet (adapté de Shukla & Rao, 2017).

Bien qu'il s'agisse d'une méthode indirecte d'estimation de la biomasse adhérente, la méthode de coloration au CV présente trois avantages principaux. Premièrement, c'est une méthode polyvalente, puisqu'elle peut être utilisée avec un large éventail d'espèces bactériennes différentes (Reynolds & Fink, 2001). Deuxièmement, les micro-organismes n'ont pas besoin d'être détachés du support, comme c'est le cas pour le comptage sur plaque, ce qui évite une

estimation biaisée du nombre de cellules dans le biofilm. Enfin, la méthode permet de tester de nombreuses conditions différentes simultanément. Les limites comprennent quant à elles le manque de reproductibilité (Arnold, 2008), la nature non spécifique du CV qui ne permet pas la différenciation des espèces dans les communautés multi-espèces, l'absence d'un protocole standardisé, malgré son utilisation répandue, ce qui entraîne une grande variété de protocoles de coloration qui rend difficile la comparaison des résultats entre différentes études.

1.3. Imagerie par résonance magnétique nucléaire

Toutes les molécules, dont celles présentes au sein des biofilms, sont constituées de noyaux atomiques pouvant être porteurs d'un moment angulaire et donc d'un moment magnétique (Fysun *et al.*, 2019). Sous l'influence d'un champ magnétique externe, l'interaction du moment magnétique avec le champ magnétique entraîne l'alignement des spins nucléaires et crée ainsi un vecteur de magnétisation dans l'échantillon (Manz *et al.*, 2003). L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) repose sur le principe de modulation de ces vecteurs, proportionnelle au champ magnétique polarisant. Cette manipulation permet d'obtenir des images 2D et 3D de la distribution du spin (figure 13). La RMN est basée sur des propriétés qui existent dans toutes les molécules. Bien que plusieurs articles affirment que la RMN est une technique de détection *in situ* et non destructive du biofilm (Fysun *et al.*, 2019; Manz *et al.*, 2003), cette affirmation est relative, car l'échantillon de biofilm examiné doit être fixé dans un champ magnétique généré pour réaliser l'imagerie RMN (Fysun *et al.*, 2019; Manz *et al.*, 2003; Vogt *et al.*, 2013). La nécessité de placer un échantillon dans un spectromètre RMN peut rendre cette technique de détection du biofilm destructive en raison du transfert du biofilm dans le spectromètre et supprime les avantages d'une mesure *in situ* directe. C'est également une technique très coûteuse.

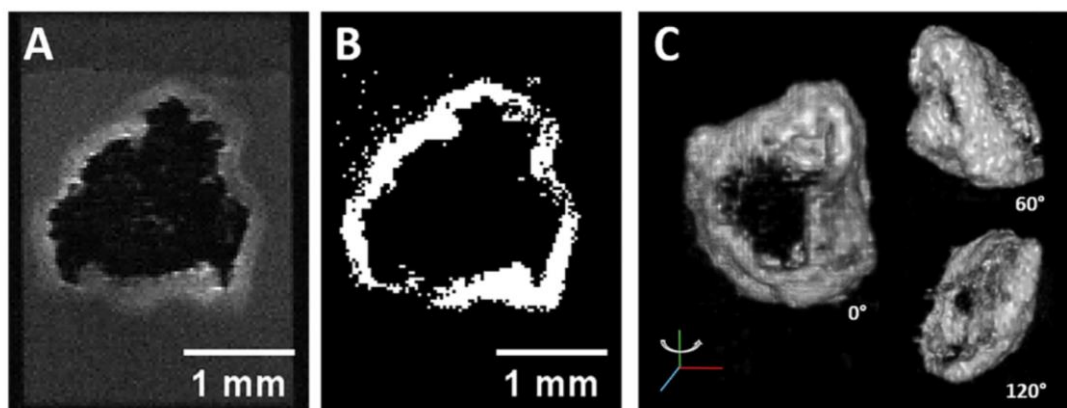


Figure 13 : A) Un plan de coupe transversale à travers l'ensemble de données 3D d'un biofilm multi-espèce B) Le même plan est représenté après un traitement informatique. C) Reconstitution de volume en 3D, représentée sous 3 angles (rotation sur l'axe vertical) (adapté de Fysun *et al.*, 2019).

1.4. Hybridation *in-situ* en fluorescence

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a été développée pour l'identification des bactéries dans les années 90 (Amann *et al.*, 1990) et a offert la première possibilité d'identification phylogénétique des bactéries par microscopie. Elle a donc ouvert de nombreuses voies de recherche pour étudier l'organisation spatiale des communautés microbiennes mixtes, telles que les biofilms, ou des bactéries ayant des processus métaboliques différents. En FISH, des sondes oligonucléotidiques (généralement de 15 à 25 nucléotides de long) marquées par fluorescence s'hybrident à l'ARN ribosomal dans des cellules qui ont été fixées et perméabilisées afin d'assurer une hybridation rigoureuse de la sonde à la séquence cible. Les défis de la méthode étaient initialement de garantir une hybridation nulle ou très faible avec les séquences non ciblées, l'application simultanée de plusieurs sondes et la détection de bactéries inactives avec peu de ribosomes. Bien que la méthode soit encore largement utilisée dans sa forme originale, plusieurs développements ont augmenté ses performances et élargi son application. Cette technique présente de nombreux avantages mais est également associée à des limitations telles que la fixation de l'échantillon éliminant la possibilité d'étudier un échantillon dans le temps, les étapes de préparation importantes et l'utilisation d'un marqueur exogène génétiquement ciblé qui nécessite la connaissance des bactéries cibles (Beier *et al.*, 2012).

2. Méthodes d'observation microscopique

2.1. Microscopie optique

La microscopie optique reste une technique de base utile pour fournir une identification visuelle de la formation de biofilms. La détection du biofilm par les méthodes de coloration classiques a été utilisée pour une évaluation quantitative de la biomasse du biofilm (de Carvalho & da Fonseca, 2007) et pourrait avoir une valeur pronostique importante (Hong *et al.*, 2014). Il a été constaté que l'absorption de la lumière par les biofilms était corrélée à la masse des cellules du biofilm et à la masse totale du biofilm.

Dans une méthode décrite par de Carvalho et da Fonseca (2007), la structure et le volume des biofilms ont été étudiés à l'aide d'un microscope optique, ce qui évite d'avoir recours à des microscopes plus coûteux (de Carvalho & da Fonseca, 2007). Cette méthode est basée sur la relation linéaire entre l'intensité d'un pixel dans les images de biofilms saisies sur le plan x-y et le nombre correspondant de cellules dans la direction z, ce qui permet de calculer l'épaisseur du biofilm. La microscopie optique est avantageuse car elle nécessite en général peu de préparation

de l'échantillon et reste simple à réaliser. Cependant, elle présente certaines limites inhérentes comme le niveau de grossissement et de résolution nécessaire pour déterminer les relations intercellulaires et cellulaires-abiotiques, la saturation de l'intensité des pixels et la différenciation morphotypique reste relativement grossière et manque de détails discriminants, en particulier dans les biofilms plus épais.

2.2. Microscopie Raman

Initialement proposée pour remplacer l'hybridation *in situ* en fluorescence, la spectroscopie Raman est largement utilisée pour l'identification bactérienne. Cette technique est basée sur la diffusion Raman, lorsque des photons sont diffusés par une molécule à des fréquences différentes de celle de la lumière incidente (Lohumi *et al.*, 2017). Comme les fréquences des photons diffusés dépendent des types de liaisons dans la molécule, le spectre Raman de chaque molécule est unique et peut être considéré comme une empreinte digitale de cette molécule. La résolution spatiale limitée par diffraction de la spectroscopie Raman est d'environ 1 μm , ce qui permet une analyse détaillée de structures complexes contenant divers types de molécules et de groupes moléculaires tels que les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques. Il s'agit d'une technique non-destructive. Il n'est pas nécessaire de colorer les échantillons ni de les sécher car la diffusion Raman de l'eau est très faible par rapport aux autres molécules ce qui rend cette technique particulièrement adaptée à l'étude des biofilms.

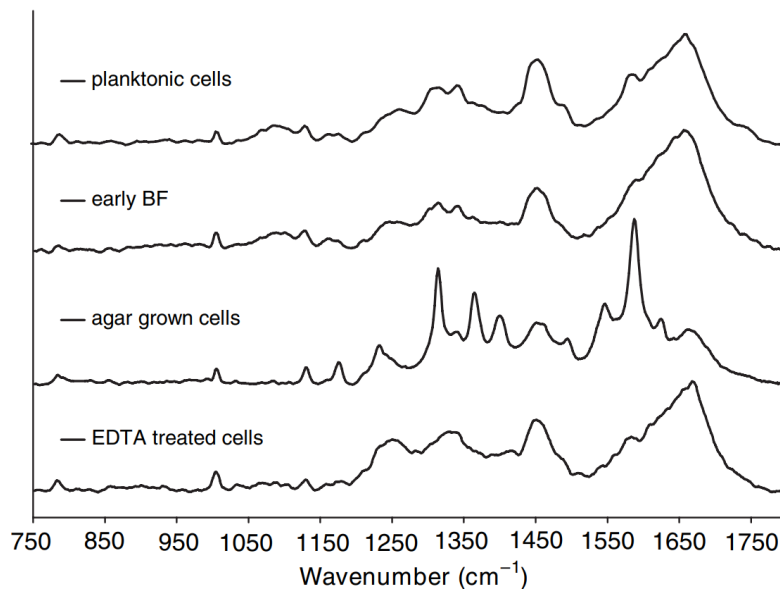


Figure 14 : Spectres Raman obtenus à partir de cellules de souche PAO1 cultivées dans différentes conditions. De haut en bas : Inoculum de 48 heures, biofilm précoce à 2 μm sous la surface de la lamelle de verre, cellules cultivées dans un milieu TSA à 48 heures, cellules traitées à l'EDTA à 48 heures (adapté de Sandt *et al.*, 2007).

Des analyses détaillées de la composition des biofilms ont été réalisées par Sandt et al (2007) : la structure et la composition des biofilms hydratés cultivés dans une cellule à écoulement ont été étudiées en utilisant, pour la première fois, la microscopie confocale Raman. La cartographie Raman des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) a été réalisée depuis les attachements initiaux à la formation d'EPS dans le biofilm, les résultats de cette étude sont montrés dans la figure 14. Pendant la phase initiale de la formation du biofilm, les variations entre les spectres acquis étaient mineures. En revanche, les spectres sont devenus très variables dans le temps en raison de la composition enrichie du biofilm. Un traitement à l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) a permis de retrouver un spectre caractéristiques des premières étapes d'adhésion.

La spectroscopie Raman est une technique adaptée pour l'identification de la composition d'un biofilm au niveau moléculaire. Les temps d'analyse sont courts et sa facilité d'application par rapport aux autres techniques conventionnelles utilisées dans ces domaines est avantageuse. La combinaison de cette technique avec d'autres techniques microscopiques, spectroscopiques et moléculaires de caractérisation des biofilms permet également de mieux comprendre la nature complexe des biofilms. Le biofilm étant une structure en 3D, la spectroscopie Raman est limitée aux changements spatiaux et chimiques de la surface du biofilm, ce qui peut compliquer la compréhension de la structure du biofilm et la communication intercellulaire.

2.3. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie confocale s'est récemment imposée comme moyen d'investigation volumique et temporelle de spécimens. Une représentation en trois dimensions est obtenue par construction d'une pile de coupes en deux dimensions, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux. Le principe général de cette approche est schématisé dans la figure 15. Le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant d'autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueurs d'onde puis détectés par des photo-multiplieurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image. Chaque section optique est générée en déplaçant le faisceau laser sur une partie du domaine admissible de l'échantillon. La profondeur du plan focal est ensuite modifiée finement grâce à un moteur contrôlé par ordinateur pour produire la séquence de sections.

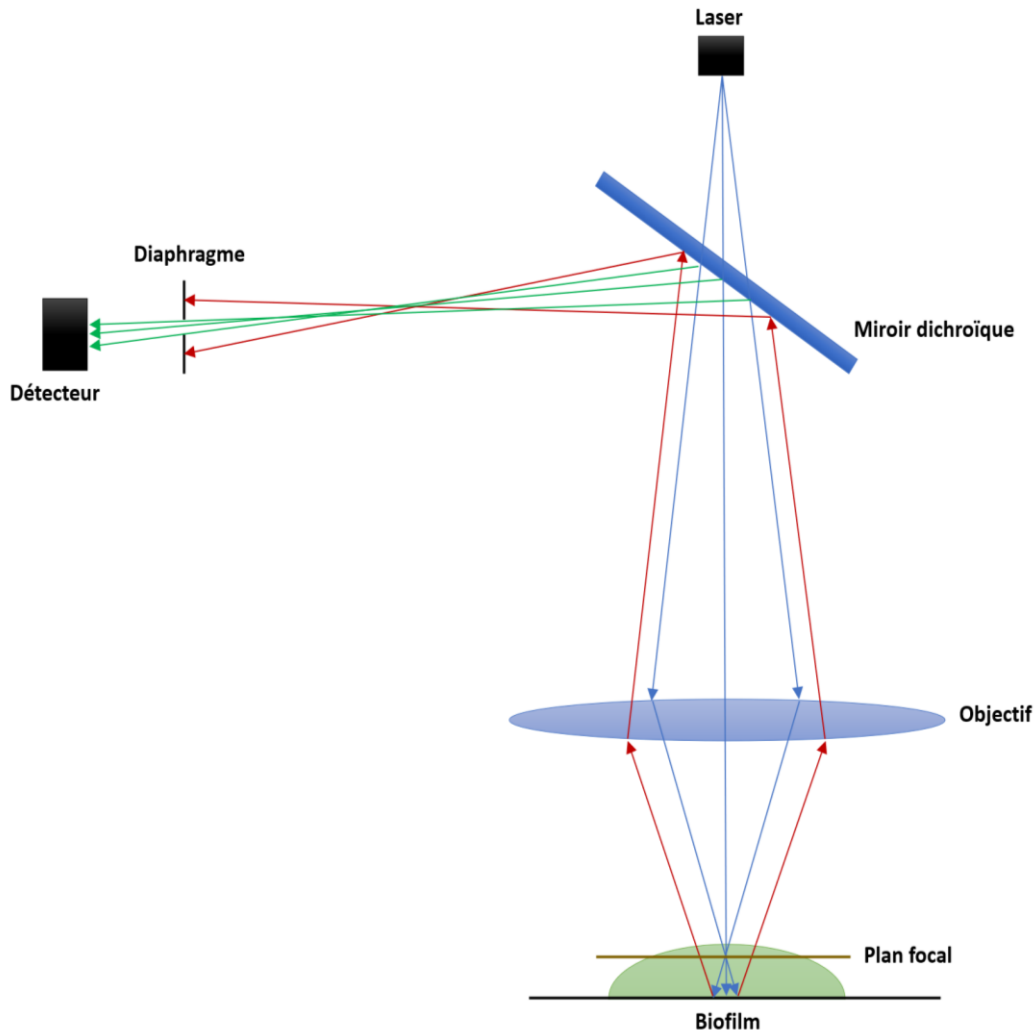


Figure 15 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.

En CLSM, les acquisitions multiples de plusieurs plans correspondant chacun à différentes profondeurs permettent de représenter l'architecture 3D de l'échantillon (figure 16) et d'extraire des paramètres structuraux quantitatifs tels que le bio-volume, l'épaisseur et la rugosité du biofilm (Bridier *et al.*, 2013). Elle a été appliquée avec succès dans un large éventail de biofilms (Guilbaud *et al.*, 2015; Reichardt & Parsek, 2019; Sun *et al.*, 2015). L'imagerie CLSM des biofilms peut être réalisée avec une gamme de sondes fluorescentes aux spécificités uniques. Les colorants les plus largement utilisés pour marquer les cellules microbiennes dans le biofilm sont des colorants d'acide nucléique perméables aux cellules, par exemple SYTO-9 et SYBR-Green (Neu & Lawrence, 2014a, 2014b).

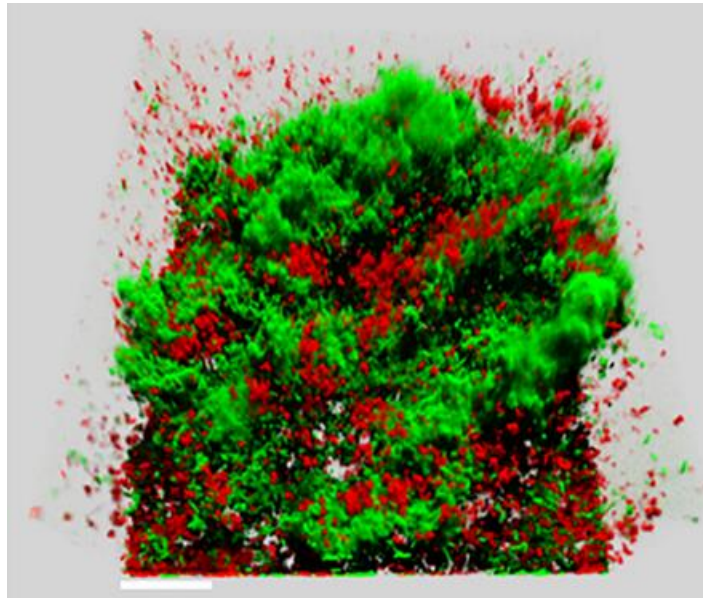


Figure 16 : Organisation tridimensionnelle d'un biofilm mixte de *B. subtilis* (rouge) et *S. aureus* (vert). La barre d'échelle représente 50 µm (adapté de Sanchez-Vizuete *et al.*, 2015).

Il est également possible de modifier génétiquement des organismes. L'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) permet de détecter *S. aureus* dans la figure 16 (Sanchez-Vizuete *et al.*, 2015). Bien que la construction génétique des souches puisse être difficile et chronophage, cette approche a l'avantage unique d'être compatible avec l'imagerie du biofilm en temps réel. Dans le contexte des biofilms multi-espèces, cela a permis d'analyser la compétition inter-espèces (Bridier & Briandet, 2014) et d'identifier les molécules clés impliquées dans la formation des biofilms (Sanchez-Vizuete *et al.*, 2015). Les limites de l'analyse des biofilms par CLSM incluent de nombreuses interférences dues aux propriétés physico-chimiques du biofilm sur les sondes de fluorescence et l'auto-fluorescence naturelle de l'échantillon qui peut masquer le signal d'intérêt.

2.4. Microscope électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage est basée sur la diffusion et l'absorption des électrons par le matériau. Les analyses au MEB ont une grande profondeur de champ et donnent une apparence 3D, utile pour comprendre la structure de surface de l'échantillon, bien que manquant de résolution verticale (Kennedy *et al.*, 2016). En conséquence, le MEB a été une méthode privilégiée pour visualiser les biofilms car il fournit des informations sur la structure spatiale et détecte la présence d'EPS (Hung *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013). C'est un outil extrêmement utile pour l'analyse comparative dans la recherche sur les biofilms, en particulier lors de l'évaluation des effets anti-biofilm d'un composé ou d'un traitement. Le MEB a généralement été utilisé pour valider qualitativement les résultats d'autres études avec une corrélation élevée avec les résultats obtenus (Hasan *et al.*, 2015; Hrubanova *et al.*, 2018; Kerekes *et al.*, 2019).

La figure 17 est un exemple d'observation de biofilms de deux souches de *Listeria monocytogenes* et d'*Escherichia coli* au microscope électronique à balayage. Une approche quantitative au MEB pour les biofilms bactériens et fongiques a été proposée par plusieurs auteurs (Bressan *et al.*, 2014; Ceresa *et al.*, 2015; Nishitani *et al.*, 2015) où des images numériques haute résolution sont acquises pour une analyse de la région d'intérêt. Les images sont généralement produites par un logiciel d'imagerie dédié. Le MEB présente de nombreux avantages dont une bonne résolution de visualisation (de 50 à 100 nm) et une profondeur de champ plus élevée par rapport aux autres techniques d'imagerie. Mais il est aussi possible dans certains cas d'avoir également accès à une mesure en trois dimensions ainsi qu'une large gamme de grossissements pour, entre autres, l'analyse des échantillons de biofilm (grossissement de x20 à x30 000).

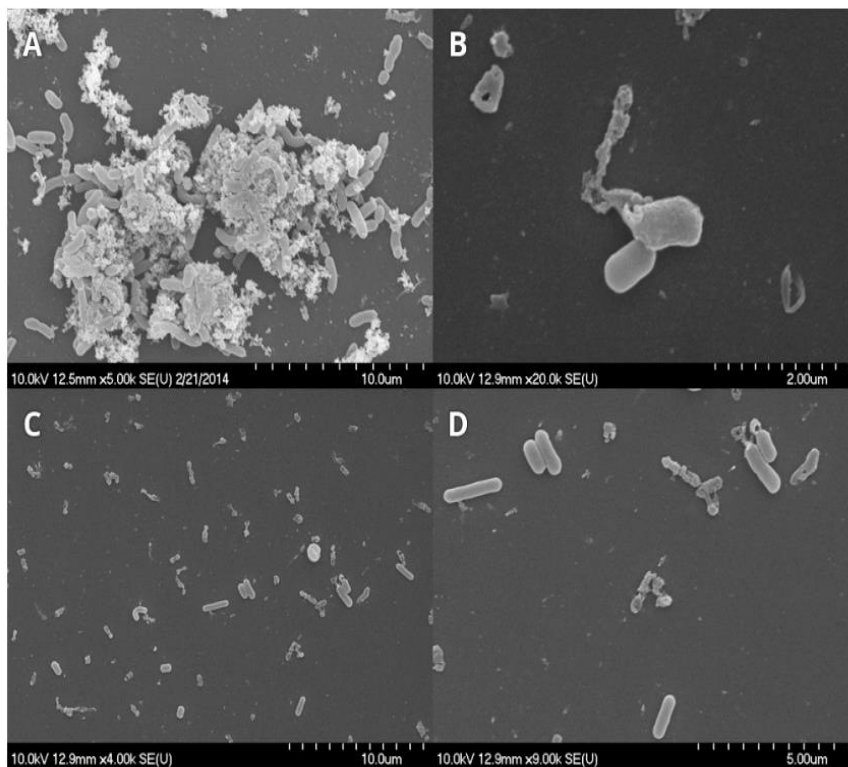


Figure 17 : Biofilms de *Listeria monocytogenes* et *E. coli* observés au MEB. Différentes molécules anti-biofilm ont été testées : (A) témoin, (B) huile essentielle de thym (0,5 mg/ml) et (C,D) thymol (0,1 mg/ml) (Kerekes *et al.*, 2019).

Les inconvénients du MEB proviennent essentiellement du processus de préparation de l'échantillon, fastidieux et long, impliquant plusieurs étapes de fixation, de déshydratation et d'enrobage avec un matériau conducteur. Ces manipulations de l'échantillon peuvent modifier la structure de la matière, provoquer des artefacts lors des observations et détruire une partie de l'échantillon. Il existe néanmoins des composés chimiques permettant de s'affranchir de certaines de ses étapes, mais leur coût est actuellement extrêmement élevé, comme le liquide ionique HILEM IL1000 ayant un coût moyen de 2000€/ml.

3. Méthodes électrochimiques

3.1. Electrode de type Clark

Les microcapteurs de type Clark (Clark *et al.*, 1953) sont les sondes électrochimiques les plus couramment utilisées et sont actuellement considérés comme la référence (Tomazinho *et al.*, 2015) pour la détection de l'oxygène dans les biofilms. Ces capteurs d'oxygène consistent en un système électrochimique à trois électrodes avec une électrode de référence (RE), une électrode auxiliaire/contre-électrode (CE) et une électrode de travail (WE) dans une solution aqueuse. Ce système à trois électrodes est isolé du milieu par une membrane sélective perméable aux gaz à travers laquelle l'oxygène diffuse vers la cathode (WE), à une vitesse proportionnelle à sa pression partielle. Ainsi, le courant de réduction généré à la cathode est directement proportionnel à la concentration d'oxygène dans la solution d'essai. Le potentiel de l'électrode de travail est généralement fixé autour de -800 mV (par rapport à Ag/AgCl) afin que la réaction globale puisse avoir lieu. Les microcapteurs de type Clark sont largement utilisés pour surveiller les biofilms (Revsbech, 2021). Cependant, leur fabrication présente d'importantes limitations. La plupart de ces capteurs sont fabriqués manuellement à partir de capillaires de verre tirés, et leurs principales limites sont la fragilité et le coût unitaire élevé des dispositifs.

3.2. Potentiel de circuit ouvert (OCP)

L'intégration d'électrodes dans les systèmes d'étude des biofilms est nécessaire pour évaluer les caractéristiques électriques de ces structures particulières et ainsi détecter leur présence essentiellement dans le domaine de la biocorrosion (Dec *et al.*, 2016; Schrott *et al.*, 2019). En général, ces études se focalisent sur les biofilms électroactifs, ciblés comme matériaux fonctionnels destinés à être utilisés dans des systèmes bioélectrochimiques (Poma *et al.*, 2020). Le potentiel de circuit ouvert (OCP) est l'une des techniques de mesure les plus inertes pour le biofilm. Elle consiste à mesurer la différence de potentiel entre une sonde et une électrode de référence. Plusieurs combinaisons de matériaux sont utilisées à cet effet et dépendent du milieu dans lequel les études sont réalisées, comme par exemple l'eau de mer ou les systèmes d'eau de refroidissement (Abi Nassif *et al.*, 2020; George *et al.*, 2016; Huttunen-Saarivirta *et al.*, 2018). Un aspect critique de cette technique est l'évaluation statistique et l'interprétation du signal enregistré. Comme aucun courant externe n'est appliqué lors des mesures d'OCP, elles ne modifient pas le biofilm, ce qui pourrait être le cas avec d'autres méthodes utilisant des signaux électriques. Dans un ensemble défini de conditions, l'OCP peut indiquer l'activité microbienne et être corrélé avec la présence de biomasse, mais il est difficile d'obtenir des mesures quantitatives.

3.3. Capteur de biofilm ALVIM

La dépolarisation cathodique induite par la croissance du biofilm a été largement étudiée au cours des 20 dernières années, aussi bien en eau de mer qu'en eau douce. Récemment, il a été prouvé que l'activité électrochimique des biofilms aquatiques naturels est proportionnelle à la surface couverte par les bactéries (Wang *et al.*, 2022). Par conséquent, la mesure du signal électrochimique du biofilm permet de savoir, en temps réel, quelle est la couverture du biofilm sur une surface. Dans le but de surmonter les limitations présentées par les mesures *ex situ*, un dispositif nommé ALVIM a été développé, exploitant la dépolarisation cathodique induite par la croissance du biofilm sur les alliages exposés aux eaux naturelles.

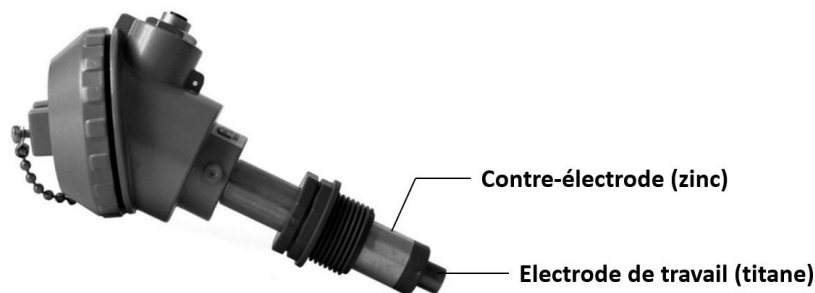


Figure 18 : Photographie d'un capteur ALVIM A001S3, approprié pour la plupart des applications industrielles.

Le capteur ALVIM (figure 18) est un système de surveillance du biofilm en temps réel. Le capteur est robuste mais les variations des conditions physico-chimiques de l'eau peuvent impacter les mesures (Compte *et al.*, 2021) notamment les valeurs du pH. De plus, ce capteur doit être appliqué dans des conditions d'eau en mouvement, car il s'agit d'exigences d'installation, et il a été constaté que le signal affichait une dérive lors de mesures en milieu stationnaire (Compte *et al.*, 2021).

3.4. Spectroscopie d'impédance électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) est employée pour étudier les systèmes électrochimiques microbiens et peut être utilisée pour évaluer indirectement la biomasse des biofilms (Dominguez-Benetton *et al.*, 2012). Dans cette approche, une perturbation de tension alternative de faible amplitude est appliquée sur une électrode recouverte d'un biofilm, et le courant alternatif résultant est enregistré à différentes fréquences. Parmi l'ensemble des méthodes de l'EIS, les capteurs basés sur l'impédance sont vraiment avantageux compte tenu de leur capacité à effectuer une détection sans marqueur, de leur faible coût de production et de leur facilité de miniaturisation. Les mesures peuvent être effectuées en mode faradique ou non faradique.

3.4.1. Mode faradique

Pour évaluer l'impédance d'un système électrochimique dans les biocapteurs faradiques, la surface modifiée de l'électrode du biocapteur est immergée dans une solution contenant un médiateur d'électrons. Les paires redox les plus couramment utilisées sont $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (ferricyanure/ferrocyanure) et $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ (hexaammineruthénium (II/III)). Les résultats sont généralement interprétés sous la forme de graphiques de Nyquist (impédance) et de Bode (fréquence d'excitation). À l'aide d'un modèle mathématique adéquat, il est possible de représenter les résultats obtenus en utilisant un circuit équivalent. Dans ce circuit, chacune des différentes composantes représente un élément réel à l'intérieur de la cellule électrochimique comme avec l'exemple de la figure 19 qui représente une interface entre une électrode et un milieu liquide. Cette approche est néanmoins à double tranchant. D'un côté, elle permet de bien visualiser les différentes couches à la surface de l'électrode en plus d'expliquer leur fonction individuelle. Par contre, il est possible de faire correspondre les courbes expérimentales à plus d'un circuit électrique. Il est donc primordial de choisir le modèle le plus pertinent correspondant à la situation étudiée (Zarabadi *et al.*, 2019). En utilisant une cellule à trois électrodes, une étude EIS a permis de suivre la capacité et la résistance d'un biofilm, et ainsi de mettre en évidence des changements subtils dans la biomasse et la structure du biofilm à l'interface électrode-biofilm, qui n'étaient pas visibles à partir de mesures optiques (Zarabadi *et al.*, 2017).

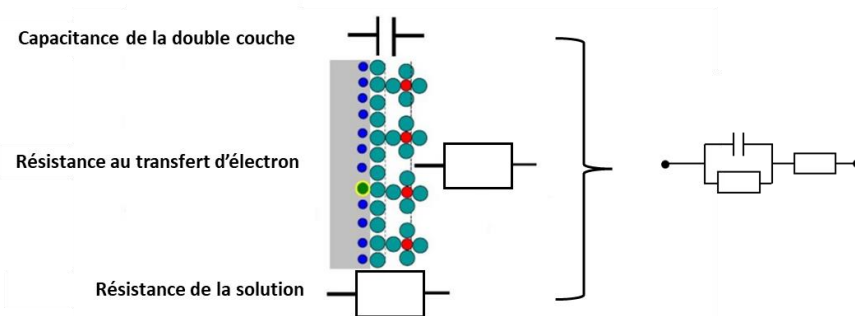


Figure 19 : Circuit équivalent simple de la surface d'une électrode.

Dans les systèmes à trois électrodes, le courant circulant entre l'électrode de travail et la contre-électrode est généralement mesuré tandis que le potentiel de l'électrode de travail est réglé par rapport à une électrode de référence. Cette approche augmente le nombre de techniques électrochimiques applicables, en utilisant l'application de potentiel statique (chronoampérométrie), de potentiel balayé (voltampérométrie cyclique) et de tensions alternatives à fréquence variable (EIS). Ces systèmes offrent la possibilité d'étudier de manière sophistiquée le transfert de charge et la cinétique de réaction, ainsi que d'isoler et d'identifier les différentes résistances électriques présentes dans le système.

3.4.2. Mode non-faradique

Les mesures non-faradiques ne nécessitent aucun réactif supplémentaire et l'impédance dépend principalement de la capacité interfaciale de l'électrode (Guimerà *et al.*, 2015). Il a été démontré que les transducteurs à réseau d'électrodes interdigitées (figure 20), constitués d'une paire d'électrodes métalliques en forme de peigne déposées sur un substrat isolant, sont vraiment avantageux en termes de cinétique de détection et d'établissement rapide d'un signal en régime permanent (Brosel-Oliu *et al.*, 2017). En outre, comme les mesures sont effectuées en mode non faradique, le signal appliqué et la réponse en courant sont mesurés entre la paire d'électrodes se faisant face, ce qui élimine le besoin d'une électrode de référence. Comme les deux électrodes sont généralement constituées du même matériau, la différence de potentiel électrique entre elles est proche de zéro et l'impédance dans une solution aqueuse ne dépend principalement que de la conductivité de la solution et de la capacité interfaciale des électrodes (Brosel-Oliu *et al.*, 2017).

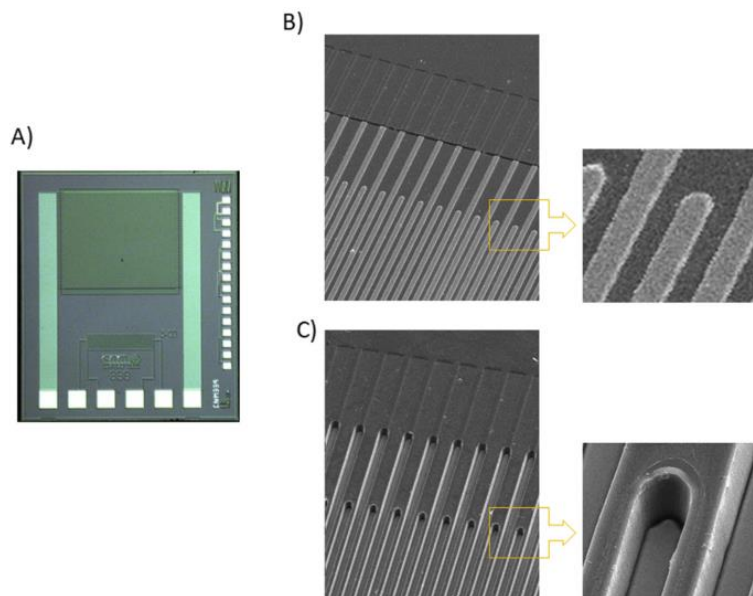


Figure 20 : Image optique de la surface d'une électrode interdigitée (A) et images réalisées au MEB de doigts d'électrodes interdigités d'une architecture planeaire (B) et 3D (C) (adapté de Brosel-Oliu *et al.*, 2017).

L'importance de la technique de spectroscopie d'impédance pour la détection des bactéries a augmenté de manière significative au cours des dernières décennies. Les avantages des réseaux d'électrodes interdigités offrent des méthodes peu coûteuses et faciles à utiliser pour le suivi de la croissance des micro-organismes et la détection spécifique de bactéries. Le grand nombre de publications consacrées à la recherche fondamentale et aux applications de ces biocapteurs reflète l'importance de ce domaine. Cependant, les principaux désavantages liés à cette technique, quel que soit le mode d'utilisation (faradique ou non-faradique) sont :

- Les effets de matrice des échantillons complexes, tels que les biofilms qui rendent les données difficiles à exploiter
- Le manque de reproductibilité
- L'absence de méthodologie d'entretien permettant d'utiliser le capteur plusieurs fois sans passer par une étape de décollage manuel du biofilm

Il convient de noter que les problèmes susmentionnés ne sont pas spécifiques à la spectroscopie d'impédance. D'autres technologies, comme le capteur ALVIM et les mesures d'OCP, en souffrent. En général, les études d'impédance pour l'élaboration de capteurs bactériens expliquent difficilement le lien entre les processus d'adhésion à la surface du capteur et les circuits électriques équivalents.

4. Autres méthodes biologiques

4.1. Détermination des unités formants de colonies (UFC)

La technique la plus utilisée pour estimer la viabilité des cellules d'un biofilm est la détermination des unités formant colonies (UFC) sur milieu gélosé. Basée sur l'approche des dilutions en série utilisée pour quantifier les cellules, cette technique présente cependant de sérieux inconvénients et limitations (Li *et al.*, 2014). La fraction de cellules vivantes détachées peut ne pas être représentative de la population initiale du biofilm et une sous-population de cellules du biofilm peut être viable mais non cultivable et ne serait pas détectée par la détermination des UFC. Alternativement, la cytométrie en flux, couplée à quelques fluorophores, a été utilisée pour déterminer rapidement et précisément la viabilité cellulaire des biofilms (Cerca *et al.*, 2011 ; Oliveira *et al.*, 2015). Bien que définitivement plus coûteuse, la cytométrie en flux résout les deux limites du comptage des UFC en permettant de différencier les UFC totales, mortes et viables mais non cultivables.

4.2. Réaction polymérase en chaîne (PCR)

La quantification des cellules vivantes au sein du biofilm par réaction polymérase en chaîne quantitative (q-PCR) a été proposée comme alternative à la culture cellulaire classique. Cependant, cette approche peut conduire à une surestimation du nombre de cellules viables en raison de la présence d'ADN extracellulaire (ADNe) libre (Magalhães *et al.*, 2019) et d'ADN provenant de cellules mortes. Cette méthode a été utilisée pour dénombrer les cellules viables dans les biofilms (Chern *et al.*, 2015; França *et al.*, 2012) et pour quantifier les différentes souches dans les biofilms d'espèces mixtes (Magalhães *et al.*, 2019). Cependant, cette technique présente

certaines inconvénients comme la discrimination entre les cellules viables et les cellules mortes qui est uniquement basée sur l'intégrité de la membrane (Tavernier & Coenye, 2015) et la présence d'un nombre élevé de cellules mortes peut affecter la quantification des cellules viables (Fittipaldi *et al.*, 2012).

4.3. Réflectométrie des ultrasons

Les mesures ultrasoniques sont basées sur la propagation des ondes sonores dont la vitesse dépend de la densité de masse et de l'impédance du milieu (Wang *et al.*, 2018). À l'interface entre le support de croissance et le biofilm, l'amplitude de l'onde réfléchi dépend de la différence d'impédance acoustique entre les milieux de part et d'autre de l'interface et de la topographie de l'interface. L'impédance, les propriétés de l'interface et la longueur du trajet peuvent changer avec la croissance d'une couche de biofilm (Sim *et al.*, 2013). Cela entraîne un changement de l'amplitude et des temps de propagation des ondes sonores. Ces changements peuvent être analysés pour surveiller quantitativement et en temps réel la colonisation d'une surface (Sim *et al.*, 2013). Malgré le manque d'articles scientifiques mettant en relation l'utilisation d'ondes ultrasonores avec la détection du biofilm dans des conditions naturelles, Wang *et al.* (2018) fournissent des informations qui peuvent être utilisées pour valider l'application possible de cette méthode pour la détection du biofilm dans les bioréacteurs (Wang *et al.*, 2018).

5. Bilan comparatif des méthodes

La physiologie des cellules individuelles et les interactions à l'intérieur d'un biofilm ont été analysées à un niveau de détail de plus en plus élevé, facilité par le développement de nouveaux outils matériels, tels que la microscopie à haute résolution et les nouvelles méthodes électrochimiques. Les outils moléculaires deviennent également prédominants et plus accessibles qu'auparavant, permettant l'étude approfondie des structures complexes des biofilms. De nouvelles technologies, telles que la spectroscopie Raman, le capteur ALVIM ou encore les méthodes impédimétriques apportent une vision complémentaire aux études employant des méthodes classiques (marquage au cristal violet, comptage des UFC, détermination de masse sèche, etc.). L'ensemble des techniques décrites dans cette partie est rapporté et comparé dans le tableau 3.

Cette analyse de la littérature a permis de déterminer des tendances générales concernant les avantages et limites de chaque catégorie. D'une part, bien que les techniques chimiques, biologiques et moléculaires soient en général fastidieuses et destructrices, elles sont la base de

toute analyse approfondie des biofilms. Leur utilisation en amont permet de comprendre les processus biologiques de base des micro-organismes étudiés. Pour acquérir davantage d'informations, les techniques d'imageries microscopiques s'avèrent être très efficaces pour apporter un appui visuel aux mesures réalisées. Néanmoins, elles nécessitent souvent un lourd échantillonnage et l'utilisation de marqueurs de fluorescence est en général toxique pour les communautés bactériennes. Seule la microscopie Raman permet de corréler l'empreinte d'un biofilm avec une observation visuelle. Cependant, la structure complexe des biofilms rend l'interprétation des données difficiles et les spectres Raman obtenus sont peu reproductibles.

Les méthodes électrochimiques offrent quant à elles un bon compromis entre la sensibilité, la rapidité d'analyse et le maintien de l'intégrité structurelle du biofilm ainsi que de la viabilité des cellules. Certaines méthodes permettent de suivre la formation d'un biofilm *in situ* et en temps réel, ce qui représente un grand avantage par rapport aux techniques précédentes. De plus, leur miniaturisation en fait un choix de prédilection pour l'intégration aux structures industrielles et en milieu naturel. Néanmoins, la forte sensibilité de ces méthodes représente également un désavantage, car les signaux saturent rapidement lorsque la densité bactérienne est trop importante. Les caractéristiques électrochimiques de la solution électrolyte sont également un paramètre qui peut apporter des perturbations aux analyses. Ces méthodes nécessitent l'élaboration de modèles électriques afin d'expliquer les phénomènes. Ils doivent être sélectionnés avec circonspection car un modèle complexe peut correspondre aux données expérimentales mais ne pas être cohérent avec le système étudié.

L'analyse des biofilms est une discipline à part entière. Une étude complète ne peut être réalisée à l'aide que d'une seule catégorie de techniques. Elles sont toutes complémentaires et offrent des informations précieuses sur différents aspects des biofilms. Cependant, les utiliser toutes ensemble représente un défi financier de taille et demanderait un investissement de travail conséquent. Il est donc de la responsabilité de tous de sélectionner les techniques les plus adaptées aux objectifs fixés.

Tableau 3 : Ensemble des techniques de détection et de mesure des biofilms.

Méthode	Objectif	Avantage	Limites	Référence
<i>Masse sèche</i>	Quantification de la biomasse totale	Facile à mettre en œuvre	Aucune distinction de matière, méthode destructive	Wilson et al., 2017
<i>Coloration Crystal Violet</i>	Quantification de la biomasse adhérente	Coloration de tout type de cellules et d'EPS	Reproductibilité faible et temps de préparation long	Arnold, 2008
<i>Imagerie RMN</i>	Reconstitution de l'image 2D ou 3D d'un biofilm	Technique non destructive dans la plupart des cas	Un transfert d'échantillon peut être requis, temps d'acquisition est élevé	Fysun et al., 2019
<i>FISH</i>	Identification bactérienne	Détection rapide et précise des cellules vivantes et mortes	Sensibilité faible et difficile à utiliser avec des biofilms mixtes	Beier et al., 2012
<i>Microscopie optique</i>	Identification visuelle des biofilms	Vision large de l'échantillon et rapide à mettre en œuvre	Résolution et grossissements limités	Hong et al., 2014
<i>Microscopie Raman</i>	Suivi quantitatif de croissance par obtention d'un spectre d'empreintes digitales	Méthode non destructive avec spécificité élevée	Résolution spatiale faible et interprétation de la structure spatiale du biofilm complexe	Lohumi et al., 2017
<i>CLSM</i>	Reconstruction de la structure en trois dimension des biofilms	Identification et analyse des structures performantes et compatibles avec des biofilms mixtes	Utilisation de fluorochromes nécessaires et un échantillonnage lourd	Reichhardt et Parsek, 2019
<i>MEB</i>	Etude de la structure spatiale du biofilm	Technique optique possédant la meilleure résolution	Echantillonnage lourd	Kerekes et al., 2019
Electrode de type Clark	Mesure d'oxygène réduit	Méthode bien établie et applications variées	Fort biais induit par les variations de pH, électrodes fragiles	Tomazinho et al., 2015
<i>OCP</i>	Détermination de la biomasse par mesure de différence de potentiel	Non destructif, temps réel et mesures <i>in situ</i>	Méthode non quantitative	Poma et al., 2020
<i>Technologie ALVIM</i>	Détermination de la couverture de surface d'un biofilm	Mesures robustes et en temps réel	Ne convient pas à un système statique	Compte et al., 2021
<i>EIS - Mode faradique</i>	Mesure de la biomasse par réaction électrochimique	Non destructif, temps réel et mesures <i>in situ</i>	Interprétations des données complexes dues à l'hétérogénéité des biofilms	Zarabadi et al., 2019
<i>EIS - Mode non faradique</i>	Détection des changement d'impédance locale	Non destructif, temps réel et mesures <i>in situ</i>	Saturation rapide du signal	Brosel-Oliu et al., 2017
<i>Comptage UFC</i>	Dénombrement de la densité cellulaire	Purification et isolement de différentes souches	Longue préparation et détecte seulement les cellules cultivables	Oliveira et al., 2015
<i>PCR</i>	Détermination de la densité cellulaire par amplification de fragments d'ADN	Rapide et dénombrement de multiples espèces avec un seul échantillon	Surestimation de la quantité de cellules dans les biofilms par la présence d'ADN externe.	Magalhães et al., 2019
<i>Réfectométrie des ultrasons</i>	Mesure de la vitesse de propagation des ondes sonores dans la matière	Mesures <i>in-situ</i> , rapides et en temps réel	Manque d'information de l'impact des ondes sur les communautés bactériennes	Wang et al., 2018

IV. EMERGENCE DE TECHNIQUES RADIOFREQUENCES

1. Préambule

Les travaux sur le développement de capteurs basés sur la détection haute fréquence (HF), supérieure à 100 MHz, pour la caractérisation biologique sont récents (Jain *et al.*, 2021; Mason *et al.*, 2018; Ozturk, 2019). La HF offre les avantages d’avoir une solution non invasive et sans contact. Aucun marqueur ou autre modification n’est nécessaire, les mesures sont particulièrement rapides, précises et un suivi en temps réel sur une grande échelle de temps est possible. Cette technique est également compatible avec les environnements biologiques. La caractérisation de solvants et de liquides standards par micro-ondes a déjà été obtenue (Moolat *et al.*, 2022; Sklavounos & Barker, 2014). Les champs électriques énergétiques sont utilisés depuis longtemps pour le contrôle des populations bactériennes. Seuls, leurs effets sont difficilement observables, mais combinés avec d’autres agents dispersants ou antibiotiques, ils offrent de meilleures performances biocides. Giladi *et al.* (2008) ont par exemple prouvé l’efficacité des champs électriques non homogènes pour contrôler efficacement le taux de croissance de *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et ont montré un effet synergique lorsqu’ils sont appliqués en même temps qu’un traitement au chloramphénicol. Des études ont également montré l’éradication des biofilms de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec l’utilisation de courants continus (Boda *et al.*, 2016; Sandvik *et al.*, 2013). Des champs électriques combinés à des analogues d’AI se sont également avérés efficaces pour prévenir la croissance d’*E. coli* et ont montré un effet synergique avec la gentamicine (Subramanian *et al.*, 2016). Ces méthodes sont efficaces pour la prévention et le traitement des bactéries planctoniques et des biofilms, représentant des options alternatives complémentaires aux traitements des biofilms actuels. Ces méthodes sont surtout appliquées dans le domaine médical. Peu d’études concernent leur utilisation en dehors d’un contexte curatif pour une utilisation en tant qu’outil de diagnostic et de suivi de développement bactérien. Bien que prometteuses, ces techniques n’ont été que très peu appliquées à la détection des biofilms, et des recherches supplémentaires sont nécessaires.

2. Utilisation des capteurs radiofréquences pour l'étude des micro-organismes

2.1. Principe général

Les approches spectroscopiques diélectriques offrent un certain nombre d'avantages inhérents tels que la sélectivité (cellules vivantes ou mortes), la rapidité de la mesure et la possibilité d'étudier de nombreux paramètres (température, teneur en électrolytes, milieux acides, bulles d'air et particules solides ou semi-solides dans le milieu). Les études de la réponse diélectrique sont basées sur l'identification et l'analyse de la distribution des charges électriques dans le système étudié et sur son comportement en fonction de la fréquence. En fonction de la gamme de fréquences, divers phénomènes physiques peuvent être identifiés et les informations obtenues se rapportent à différentes échelles du système étudié.

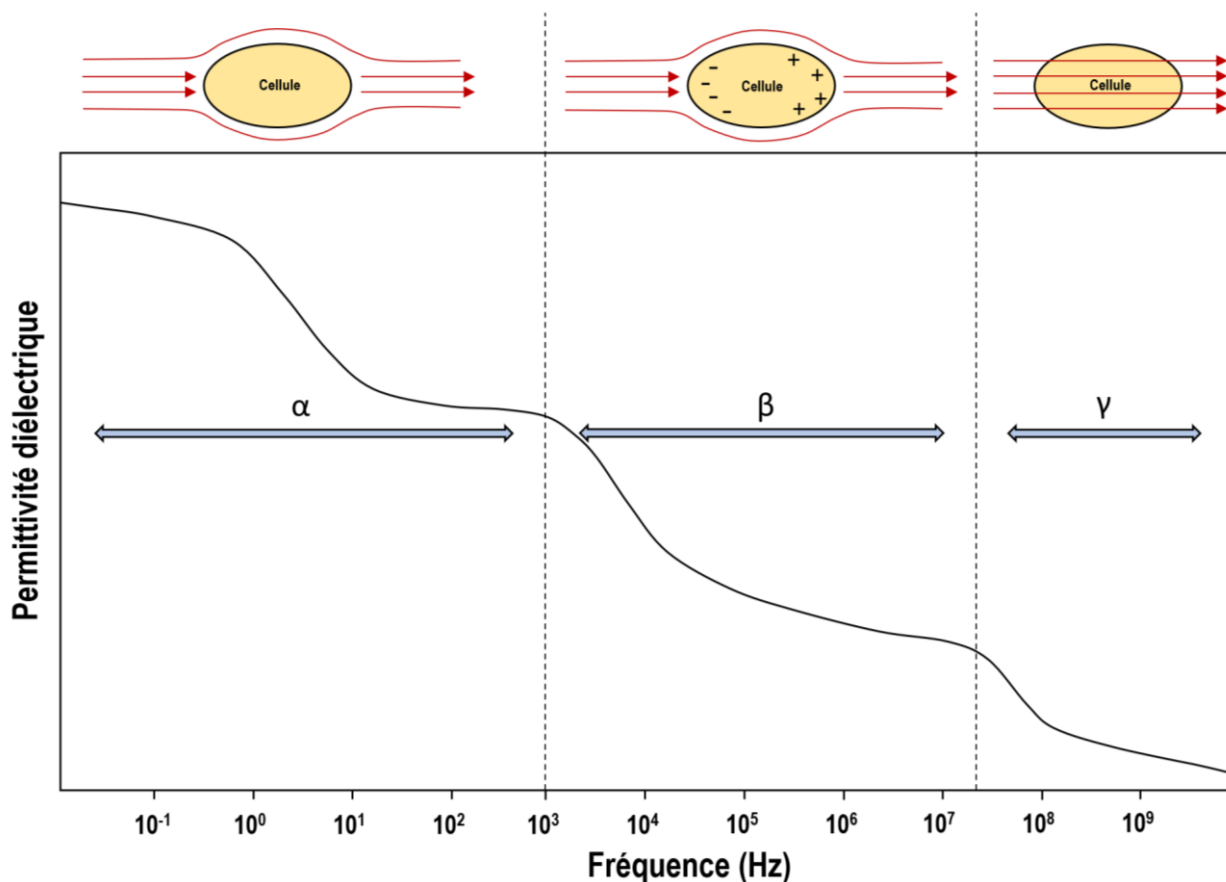


Figure 21 : Interaction d'une onde électromagnétique avec une cellule microbienne à différentes fréquences.

Dans les systèmes biologiques cellulaires, il existe trois phénomènes majeurs de relaxation diélectrique (ou de dispersion) dans lesquels la permittivité et la conductivité du système changent avec la fréquence, connus sous le nom de dispersion α , β et γ (Artis *et al.*, 2015). La dispersion α est associée à la partie inférieure du spectre de fréquence (gamme des kHz). Elle est associée à la diffusion ionique au niveau de la membrane cellulaire (Figure 21). La relaxation β se produit dans la gamme des fréquences moyennes (à partir de quelques MHz jusqu'à environ 300 MHz). Elle correspond à la polarisation des fluides intracellulaires, la membrane jouant le rôle d'un isolant. Enfin la dispersion γ , couvre la gamme des hautes fréquences du spectre, au-delà de 1 GHz. Dans ce domaine, l'oscillation du champ électrique est si importante que les charges au sein des cellules ne peuvent plus suivre les changements de direction du champ. Seules les molécules dipolaires au sein de la solution globale se réorientent. Habituellement, le modèle de Debye (Liebe *et al.*, 1991) est considéré comme suffisant pour modéliser ces processus et suppose un temps de relaxation constant.

2.2. Différents capteurs pour la caractérisation des liquides

2.2.1. Résonateurs

Au cours de la dernière décennie, plusieurs types de capteurs radiofréquences ont été élaborés dans le but d'étudier des systèmes biologiques. Les capteurs à résonateur (Chretiennot *et al.*, 2012 ; Jain, 2020 ; Narang *et al.*, 2018) sont configurés pour avoir une fréquence de résonance ou une phase d'oscillation relative dépendant des paramètres mesurés. Le principe de détection est basé sur le rayonnement naturellement émis ou réfléchi par l'objet ou la cible observés. Ces dernières années, les capteurs à résonateur ont joué un rôle clé dans la caractérisation des matériaux et leurs applications. Les techniques résonantes font généralement l'objet d'une grande attention en raison de leur précision et de leur sensibilité élevées par rapport aux techniques classiques (Jain, 2020). Bien que les résonateurs soient considérés pour leurs performances essentielles dans une gamme d'applications de communications et d'électronique micro-ondes, telles que les oscillateurs et les filtres, quelques applications ont été consacrées aux capteurs de résonateurs micro-ondes pour la caractérisation des matériaux biologiques.

De nombreuses études ont été réalisées pour la surveillance du glucose (Omer *et al.*, 2020). Les capteurs à micro-ondes ont la capacité de mesurer de manière non destructive les paramètres à l'intérieur d'un liquide, évitant les méthodes invasives nécessitant un échantillonnage de sang ou de matière biologique (biofilm, culture cellulaire) (Kim *et al.*, 2015). Qiang *et al.* (2017) ont notamment conçu un capteur afin de détecter le niveau de glucose d'une solution aqueuse,

IV – Emergence des techniques radiofréquences

représenté dans les figures 22a et 22b. Une gamme de concentrations de glucose de 5 à 60 mg/l a été placée dans une structure à volume fixe pour la détection. Les résultats ont montré une sensibilité de 1,97 MHz pour chaque pas de 10 mg/l (figure 22c). Ce type de capteur pourrait avoir des applications en microbiologie afin de déterminer le taux de glucose dans des solutions biologiques plus complexes.

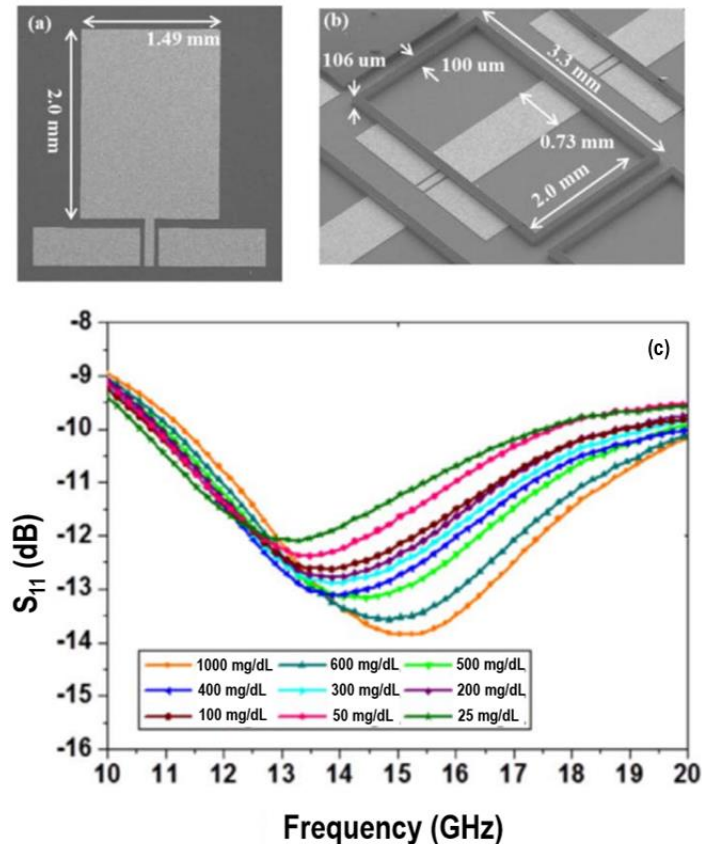


Figure 22 : Structure du résonateur seul (a) et avec réservoir (b). Les données récoltées indiquent un décalage de résonance proportionnel à la concentration en glucose (c) (adapté de Qiang *et al.*, 2017).

Narang *et al.* (2018) ont développé un biocapteur microfluidique à micro-ondes rapide, sans contact et non invasif pour mesurer la concentration et la croissance d'*E. coli* dans des suspensions à différents pH. La puce microfluidique a été injectée d'échantillons bactériens et incorporée à un capteur micro-ondes à résonateur annulaire microruban avec une fréquence de fonctionnement de 2,5 GHz pour détecter la concentration et la croissance des bactéries. La présence de différentes concentrations de bactéries a été détectée en examinant les changements dans les réponses d'amplitude et de fréquence de résonance du système. Le dispositif de détection enregistre une réponse quasi immédiate aux changements de la concentration de bactéries et une sensibilité maximale de 3,4 MHz pour chaque seuil logarithmique de la concentration bactérienne.

Une autre étude utilisant la spectroscopie diélectrique par micro-ondes s'est focalisée sur le développement d'un micro-capteur pour l'analyse moléculaire et cellulaire (Grenier *et al.*, 2018). Ces travaux mettent notamment l'accent sur le suivi possible des réactions cellulaires au niveau d'une cellule lymphatique. Ce capteur permet le suivi diélectrique de cellules individuelles sans marquage et directement dans un milieu de culture (figure 23). Cette caractéristique majeure de la spectroscopie diélectrique par micro-ondes rend cette technique particulièrement adaptée à l'analyse non-invasive et non-destructive des cellules.

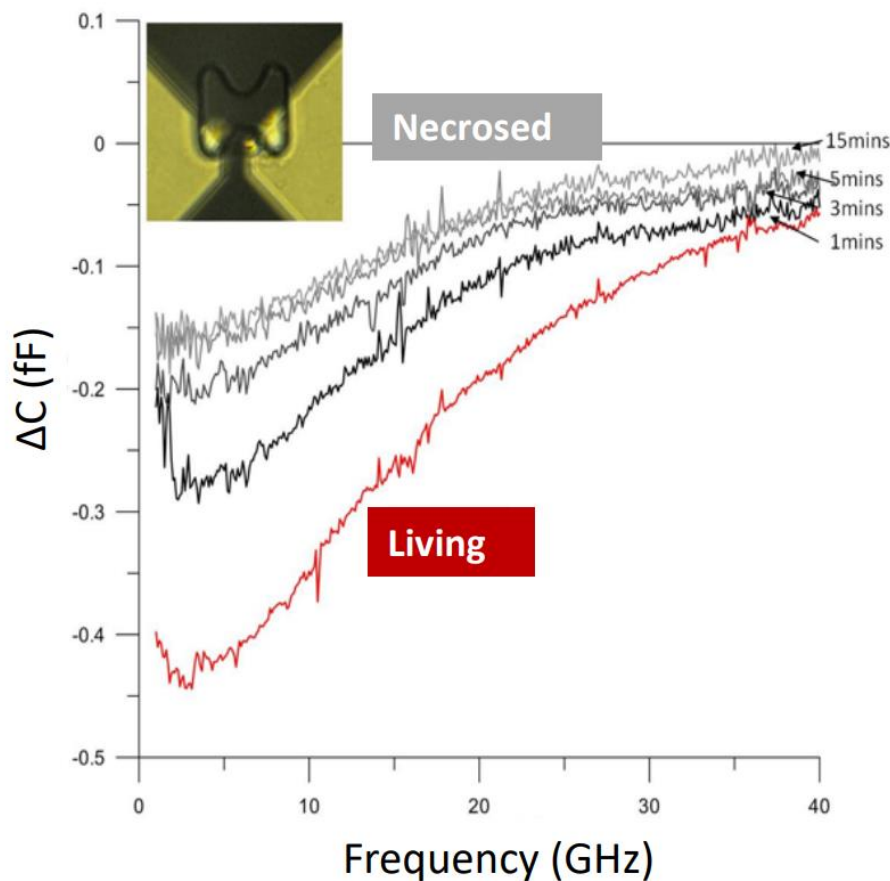


Figure 23 : Variation de la capacité d'une cellule lymphatique unique en fonction du temps. La cellule est soumise à un traitement au méthanol afin d'entraîner la mort cellulaire. Extrait de Grenier *et al.*, 2018.

Cette dernière possibilité ouvre la voie vers l'évaluation cinétique de systèmes biologiques plus complexes tels que les biofilms. Ces méthodes non destructives rendent possible le suivi des caractéristiques diélectriques d'un ensemble de cellules directement dans leur milieu de croissance. Cependant, l'architecture des capteurs doit être pleinement adaptée au système biologique ciblé.

2.2.2. Sonde coaxiale à extrémité ouverte

Les sondes coaxiales à extrémité ouverte ont été largement utilisées pour déterminer les propriétés diélectriques des matériaux dans le domaine des radiofréquences. Les sondes sont utilisées en conjonction avec un analyseur de réseau pour mesurer les propriétés électromagnétiques du matériau. La technique repose sur le principe selon lequel le coefficient de réflexion mesuré d'une sonde coaxiale chargée est lié aux propriétés diélectriques du matériau en contact avec la sonde. Les propriétés diélectriques, à leur tour, fournissent des informations sur le stockage, la dissipation et la qualité de l'énergie électrique du matériau testé (Boughriet *et al.*, 1999). Aux fréquences inférieures à 100 MHz, la sonde coaxiale est traitée comme une ligne de transmission idéale, la permittivité et la conductivité de l'échantillon sont directement liées au coefficient de réflexion mesuré. À des fréquences plus élevées, les pertes ohmiques dans les conducteurs de la sonde et les pertes diélectriques dans l'isolant de la sonde deviennent non négligeables (Ruvio *et al.*, 2018). De plus, des réflexions parasites peuvent se produire au niveau du connecteur de la sonde. Dans ce cas, un étalonnage qui corrige le coefficient de réflexion mesuré pour ces effets est nécessaire. Pour les échantillons hautement conducteurs, l'extrémité immergée de la sonde coaxiale acquiert une charge de surface à des fréquences suffisamment basses. Cette charge de surface modifie l'impédance effective de l'extrémité de la sonde et donc le coefficient de réflexion mesuré (Boughriet *et al.*, 1999 ; Ruvio *et al.*, 2018).

Dans le cadre de l'analyse des propriétés diélectriques des biofilms, l'application des sondes coaxiales peut fournir des informations précieuses sur la formation de biofilms, notamment si l'analyse se situe dans la gamme de fréquences correspondant à la relaxation β . Les sondes coaxiales ont déjà, mais rarement, été utilisées afin d'étudier la formation de biofilms en milieu contrôlé (Sarrafzadeh *et al.*, 2005) et naturel (Saber *et al.*, 2013). Cependant, dans cette gamme de fréquences, en raison de l'effet de polarisation des électrodes, les mesures d'échantillons conducteurs nécessitent des corrections pour extraire les propriétés électriques intrinsèques. Ces corrections requièrent l'élaboration d'un modèle mathématique spécifique ou l'utilisation d'un logiciel commercial, augmentant les coûts des dispositifs. De plus amples détails sur les caractérisations de liquides à partir des sondes coaxiales à extrémité ouverte seront apportés dans le chapitre suivant.

V. BILAN BIBLIOGRAPHIQUE

Présents dans de nombreux milieux (eaux aquacoles, marines et au sein des organismes vivants), les impacts sanitaires, économiques et écologiques des biofilms sont conséquents. Le développement des biofilms a fait l'objet de nombreuses études scientifiques axées sur les mécanismes de croissance, de résistance aux antibiotiques et de communication intercellulaire. Les technologies modernes ont permis d'accroître le panel de méthodes de caractérisation des biofilms pour répondre aux besoins croissants de comprendre leur fonctionnement. Néanmoins, cette revue bibliographique souligne l'existence évidente d'un manque de méthodes rapides en temps réel et peu coûteuses pour la détection précoce des biofilms. La plupart d'entre elles nécessitent de lourdes préparations (méthodes microscopiques) ou des temps de préparation et d'analyses de plusieurs jours (méthodes chimiques et moléculaires). Les techniques électrochimiques sont quant à elles plus directes, mais n'étudient que les phénomènes d'interface d'électrodes rendant difficile l'extension des résultats à l'ensemble des structures en trois dimensions telles que les biofilms.

Les techniques hyperfréquences s'affranchissent de ces contraintes et représentent un axe de recherche à fort potentiel pour l'étude en temps réel du développement d'un biofilm. Ce manuscrit est consacré à la mise en place d'un nouveau dispositif de mesure pour suivre en temps réel la formation des biofilms. Les résultats de nos recherches sont présentés en trois parties : (i) la conception et fabrication d'un nouveau capteur de biofilm basé sur l'analyse radiofréquence des liquides, (ii) la conception d'un modèle électrochimique complémentaire afin de mieux comprendre les effets d'interface engendrés par le biofilm sur le matériaux de croissance et enfin (iii) la validation du dispositif par son application dans un domaine concret, le traitement des biofilms par l'utilisation de bactériophages.

REFERENCES

- Abi Nassif, L., Rioual, S., Farah, W., Fauchon, M., Toueix, Y., Hellio, C., ... & Lescop, B. (2020). Electrophoretic deposition of zinc alginate coatings on stainless steel for marine antifouling applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104246.
- Abraham, W.-R., 2016. Going beyond the control of quorum-sensing to combat biofilm infections. *Antibiotics* 5, 3.
- Adnan, M., Alshammari, E., Patel, M., Ashraf, S.A., Khan, S., Hadi, S., 2018. Significance and potential of marine microbial natural bioactive compounds against biofilms/biofouling: necessity for green chemistry. *PeerJ* 6, e5049.
- Al Ahmar, R., 2019. Understanding *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Regulation and its Link to Chronic Lung Infections in Cystic Fibrosis Patients.
- Aldhaeabi, M.A., Alzoubi, K., Almoneef, T.S., Bamatraf, S.M., Attia, H., Ramahi, O.M., 2020. Review of microwaves techniques for breast cancer detection. *Sensors* 20, 2390.
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L.M., Chikindas, M.L., 2017. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02508-16.
- Allison, D.G., Sutherland, I.W., 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Microbiology* 133, 1319–1327.
- Anand, T., Vashisth, M., Jaglan, A., Nokhwal, A., Virmani, N., Bera, B.C., Vaid, R.K., Singh, R.K., Tripathi, B.N., 2022. Phage therapy in tackling AMR: Potential and prospects. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 43, 50–57.
- Arjes, H.A., Willis, L., Gui, H., Xiao, Y., Peters, J., Gross, C., Huang, K.C., 2021. Three-dimensional biofilm colony growth supports a mutualism involving matrix and nutrient sharing. *ELife* 10, e64145.
- Arnold, J.W., 2008. Colorimetric assay for biofilms in wet processing conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1475.
- Artis, F., Chen, T., Chretiennot, T., Fournie, J.-J., Poupot, M., Dubuc, D., Grenier, K., 2015. Microwaving biological cells: Intracellular analysis with microwave dielectric spectroscopy. *IEEE Microw. Mag.* 16, 87–96.
- Auinger, P., Lanphear, B.P., Kalkwarf, H.J., Mansour, M.E., 2003. Trends in otitis media among children in the United States. *Pediatrics* 112, 514–520.
- Balcázar, J.L., Subirats, J., Borrego, C.M., 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6, 1216.
- Bannister, J., Sievers, M., Bush, F., Bloecher, N., 2019. Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling* 35, 631–648.
- Bazaka, K., Jacob, M.V., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2012. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 299–311.
- Beloin, C., McDougald, D., 2021. Speciality Grand Challenge for “Biofilms.” *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 99.
- Bertozi Silva, J., Storms, Z., Sauvageau, D., 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw002.
- Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y.F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., Rumbaugh, K.P., Schulte, T., Sun, L., Åkerlund, B., 2018. Biofilm formation—what we can learn from recent developments. *J. Intern. Med.*
- Blakey, R.T., Morales-Partera, A.M., 2016. Microwave dielectric spectroscopy—A versatile methodology for online, non-destructive food analysis, monitoring and process control. *Eng. Agric. Environ. Food* 9, 264–273.
- Boda, S.K., Bajpai, I., Basu, B., 2016. Inhibitory effect of direct electric field and HA-Z n O composites on *S. aureus* biofilm formation. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104, 1064–1075.
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R., Maxwell, K.L., 2016. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J.* 10, 2854–2866.
- Boughriet, A., Wu, Z., McCann, H., & Davis, L. E. (1999, April). The measurement of dielectric properties of liquids at microwave frequencies using open-ended coaxial probes. In 1st world congress on industrial process tomography (pp. 318-322). Buxton Greater Manchester.
- Brackman, G., De Meyer, L., Nelis, H.J., Coenye, T., 2013. Biofilm inhibitory and eradicating activity of wound care products against *S taphylococcus aureus* and *S taphylococcus epidermidis* biofilms in an in vitro chronic wound model. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1833–1842.
- Bratov, A., Abramova, N., 2013. Response of a microcapillary impedimetric transducer to changes in surface conductance at liquid/solid interface. *J. Colloid Interface Sci.* 403, 151–156.
- Bressan, E., Tessarolo, F., Sbricoli, L., Caola, I., Nollo, G., Di Fiore, A., 2014. Effect of chlorhexidine in preventing plaque biofilm on healing abutment: a crossover controlled study. *Implant Dent.* 23, 64–68.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M.-N., Fontaine-Aupart, M.-P., 2008. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2135–2143.
- Bridier, A., Briandet, R., 2014. Contribution of confocal laser scanning microscopy in deciphering biofilm tridimensional structure and reactivity, in: *Microbial Biofilms*. Springer, pp. 255–266.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R., 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J. Microbiol. Methods* 82, 64–70.
- Bridier, A., Meylheuc, T., Briandet, R., 2013. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 48, 65–69.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T.N., Pugazhendhi, A., 2020. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochem.* 96, 49–57.

- Brosel-Oliu, S., Abramova, N., Uria, N., Bratov, A., 2019. Impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays for bacterial detection—A review. *Anal. Chim. Acta* 1088, 1–19.
- Brosel-Oliu, S., Galyamin, D., Abramova, N., Munoz-Pascual, F.-X., Bratov, A., 2017. Impedimetric label-free sensor for specific bacteria endotoxin detection by surface charge registration. *Electrochimica Acta* 243, 142–151.
- Brosse, A., 2017. Circuits mixtes de régulation entre petits ARN régulateurs et systèmes à deux composants chez *Escherichia coli* (PhD Thesis). Université Sorbonne Paris Cité.
- Bull, J.J., Christensen, K.A., Scott, C., Jack, B.R., Crandall, C.J., Krone, S.M., 2018. Phage-bacterial dynamics with spatial structure: self organization around phage sinks can promote increased cell densities. *Antibiotics* 7, 8.
- Burge, S.R., Hristovski, K.D., Burge, R.G., Saboe, D., Hoffman, D.A., Koenigsberg, S.S., 2021. Microbial potentiometric sensor array measurements in unsaturated soils. *Sci. Total Environ.* 751, 142342.
- Burmölle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., Sørensen, S.J., 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22, 84–91.
- Burrowes, B., Harper, D.R., Anderson, J., McConville, M., Enright, M.C., 2011. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 775–785.
- Camilli, A., Bassler, B.L., 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311, 1113–1116.
- Cao, X., Pettitt, M.E., Wode, F., Arpa Sancet, M.P., Fu, J., Ji, J., Callow, M.E., Callow, J.A., Rosenhahn, A., Grunze, M., 2010. Interaction of zoospores of the green alga *Ulva* with bioinspired micro- and nanostructured surfaces prepared by polyelectrolyte layer-by-layer self-assembly. *Adv. Funct. Mater.* 20, 1984–1993.
- Caruso, G., 2020. Microbial colonization in marine environments: overview of current knowledge and emerging research topics. *J. Mar. Sci. Eng.* 8, 78.
- Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E.A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S.J., Wood, T.K., García-Contreras, R., 2015. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases WJCC* 3, 575.
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J.P., Bosch, J., Soto, S.M., 2019. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Microb. Drug Resist.* 25, 72–79.
- Cerca, N., Oliveira, R., Azeredo, J., 2007. Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 313–317.
- Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M., Fracchia, L., 2015. Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1116–1125.
- Chern, E.C., King, D., Haugland, R., Pfaller, S., 2015. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction assays targeting *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. avium* subspecies paratuberculosis in drinking water biofilms. *J. Water Health* 13, 131–139.
- Choi, H., Luzio, S., Porch, A., 2016. Dielectric properties of aqueous glucose solutions using microwave cavity and coaxial probe, in: 2016 IEEE 2nd Australian Microwave Symposium (AMS). IEEE, pp. 7–8.
- Chretiennot, T., Dubuc, D., Grenier, K., 2012. A microwave and microfluidic planar resonator for efficient and accurate complex permittivity characterization of aqueous solutions. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 61, 972–978.
- Chu, J., Zhao, Y., Li, S.-H., Yu, H.-Q., Liu, G., Tian, Y.-C., 2015. An integrated solid-state pH microelectrode prepared using microfabrication. *Electrochimica Acta* 152, 6–12.
- Cicinelli, E., De Ziegler, D., Nicoletti, R., Tinelli, R., Saliani, N., Resta, L., Bellavia, M., De Vito, D., 2009. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 68, 108–115.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., 2019. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front. Microbiol.* 913.
- Ciriminna, R., Bright, F.V., Pagliaro, M., 2015. Ecofriendly antifouling marine coatings.
- Clark, J.R., 2015. Bacteriophage therapy: history and future prospects. *Future Virol.* 10, 449–461.
- Clark JR, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z., 1953. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.* 6, 189–193.
- Clokic, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45.
- Cohen, B.E., 2014. Functional linkage between genes that regulate osmotic stress responses and multidrug resistance transporters: challenges and opportunities for antibiotic discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 640–646.
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* 14, 1913–1928.
- Compte, A.S., Serra, C.P., Blanco, S.G., Berbel, X.M., Ackermann, T., Máñez, M., Madrigal, P.N., Amorós, M.A.Y., 2021. Tecnologías para la monitorización de biofilm a tiempo real en redes de distribución de agua potable. *Tecnoaqua* 42–47.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science* 284, 1318–1322.
- Crum, N.F., 2003. Current trends in typhoid fever. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 5, 279–286.
- Curtin, J.J., Donlan, R.M., 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1268–1275.
- Czaczyk, K., Myszk, K., 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol. J. Environ. Stud.* 16.

- Dafforn, K.A., Lewis, J.A., Johnston, E.L., 2011. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 453–465.
- Dang, H., Chen, R., Wang, L., Shao, S., Dai, L., Ye, Y., Guo, L., Huang, G., Klotz, M.G., 2011. Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon-and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters. *Environ. Microbiol.* 13, 3059–3074.
- Darch, S.E., Kragh, K.N., Abbott, E.A., Bjarnsholt, T., Bull, J.J., Whiteley, M., 2017. Phage inhibit pathogen dissemination by targeting bacterial migrants in a chronic infection model. *MBio* 8, e00240-17.
- De Fonseca, B., Rossignol, J., Stuerger, D., Pribetich, P., 2015. Microwave signature for gas sensing: 2005 to present. *Urban Clim.* 14, 502–515.
- DeAntonio, R., Yarzabal, J.-P., Cruz, J.P., Schmidt, J.E., Kleijnen, J., 2016. Epidemiology of otitis media in children from developing countries: A systematic review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 85, 65–74.
- Dec, W., Mosiak, M., Socha, R.P., Jaworska-Kik, M., Simka, W., Michalska, J., 2016. The effect of sulphate-reducing bacteria biofilm on passivity and development of pitting on 2205 duplex stainless steel. *Electrochimica Acta* 212, 225–236.
- Deng, H., Zhu, X., 2017. Emission enhancement and application of synthetic green fluorescent protein chromophore analogs. *Mater. Chem. Front.* 1, 619–629.
- Desmond, P., Best, J.P., Morgenroth, E., Derlon, N., 2018. Linking composition of extracellular polymeric substances (EPS) to the physical structure and hydraulic resistance of membrane biofilms. *Water Res.* 132, 211–221.
- D’Herelle, F., 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res. Microbiol.* 158, 553–554.
- Diler, E., Larché, N., Thierry, D., 2020. Cathodic Activity on Passive Materials in Deep Seawater. *Corrosion* 76, 344–355.
- Diler, E., Larché, N., Thierry, D., 2019. Carbon steel and Stainless-steel cathodic protection design data in Deepsea Water—Influence of the environment on the biofilm cathodic activity, in: *CORROSION 2019*. OnePetro.
- Dominguez-Benetton, X., Seveda, S., Vanbroekhoven, K., Pant, D., 2012. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. *Chem. Soc. Rev.* 41, 7228–7246.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dutta, B., Nag, M., Lahiri, D., Ray, R.R., 2021. Analysis of biofilm matrix by multiplex fluorescence in situ hybridization (M-FISH) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) during nosocomial infections, in: *Analytical Methodologies for Biofilm Research*. Springer, pp. 183–203.
- Dy, R.L., Richter, C., Salmond, G.P., Fineran, P.C., 2014. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annu. Rev. Virol.* 1, 307–331.
- Dzianach, P.A., Dykes, G.A., Strachan, N.J., Forbes, K.J., Pérez-Reche, F.J., 2019. Challenges of biofilm control and utilization: lessons from mathematical modelling. *J. R. Soc. Interface* 16, 20190042.
- e Silva, S.S., Carvalho, J.W.P., Aires, C.P., Nitschke, M., 2017. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. *J. Dairy Sci.* 100, 7864–7873.
- E Zautner, A., 2012. Adenotonsillar disease. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 6, 121–129.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., 2017. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493.
- Eriksen, R.S., Svenningsen, S.L., Sneppen, K., Mitarai, N., 2018. A growing microcolony can survive and support persistent propagation of virulent phages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 337–342.
- Faden, H., Duffy, L., Wasielewski, R., Wolf, J., Krystofik, D., Tung, Y., 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J. Infect. Dis.* 175, 1440–1445.
- Fergie, N., Bayston, R., Pearson, J.P., Birchall, J.P., 2004. Is otitis media with effusion a biofilm infection? *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 29, 38–46.
- Ferrario, J., Gestoso, I., Ramalhosa, P., Cacabelos, E., Duarte, B., Cacador, I., Canning-Clode, J., 2020. Marine fouling communities from artificial and natural habitats: comparison of resistance to chemical and physical disturbances. *Aquat. Invasions* 15.
- Ferris, R.A., McCue, P.M., Borlee, G.I., Glapa, K.E., Martin, K.H., Mangalea, M.R., Hennes, M.L., Wolfe, L.M., Broeckling, C.D., Borlee, B.R., 2017. Model of chronic equine endometritis involving a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Infect. Immun.* 85, e00332-17.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F., 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J. Microbiol. Methods* 91, 276–289.
- Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T.R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., Wuertz, S., 2021. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Npj Biofilms Microbiomes* 7, 1–5.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43, 1–8.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.
- França, A., Freitas, A.I., Henriques, A.F., Cerca, N., 2012. Optimizing a qPCR gene expression quantification assay for *S. epidermidis* biofilms: a comparison between commercial kits and a customized protocol. *PLoS One* 7, e37480.
- France, M.T., Cornea, A., Kehlet-Delgado, H., Forney, L.J., 2019. Spatial structure facilitates the accumulation and persistence of antibiotic-resistant mutants in biofilms. *Evol. Appl.* 12, 498–507.

- Freebairn, D., Linton, D., Harkin-Jones, E., Jones, D.S., Gilmore, B.F., Gorman, S.P., 2013. Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. *Expert Rev. Med. Devices* 10, 85–103.
- Friedman, L., Kolter, R., 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 675–690.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 34–40.
- Fysun, O., Anzmann, T., Kleesattel, A., Gschwind, P., Rauschnabel, J., Kohlus, R., Langowski, H.-C., 2019. Detection of *P. polymyxa* biofilm, dairy biofouling and CIP-cleaning agents using low-field NMR. *Eur. Food Res. Technol.* 245, 1719–1731.
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109–119.
- George, R.P., Mudali, U.K., Raj, B., 2016. Characterizing biofilms for biofouling and microbial corrosion control in cooling water systems. *Anti-Corros. Methods Mater.*
- Giladi, M., Porat, Y., Blatt, A., Wasserman, Y., Kirson, E.D., Dekel, E., Palti, Y., 2008. Microbial growth inhibition by alternating electric fields. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3517–3522.
- Golding, I., 2016. Single-cell studies of phage λ : hidden treasures under Occam's rug. *Annu. Rev. Virol.* 3, 453–472.
- Gómez-Suárez, C., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2001. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2531–2537.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D., 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 86–116.
- Grenier, K., Dubuc, D., Poleni, P.-E., Kumemura, M., Toshiyoshi, H., Fujii, T., Fujita, H., 2009. Integrated broadband microwave and microfluidic sensor dedicated to bioengineering. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 57, 3246–3253.
- Grenier, K., Tamra, A., Zedek, A., Poiroux, G., Artis, F., Chen, T., ... & Dubuc, D., 2018. Low volume and label-free molecules characterization and cell monitoring with microwave dielectric spectroscopy. In 2018 IEEE International Microwave Biomedical Conference (IMBioC) (pp. 82-84). IEEE.
- Grose, J.H., Casjens, S.R., 2014. Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology* 468, 421–443.
- Gu, T., 2014. Theoretical modeling of the possibility of acid producing bacteria causing fast pitting biocorrosion. *J Microb Biochem Technol* 6, 068–074.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., Briandet, R., 2015. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1813–1819.
- Guillonnet, R., Baraquet, C., Bazire, A., Molmeret, M., 2018. Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Front. Microbiol.* 1960.
- Guimerà, A., Gabriel, G., Prats-Alfonso, E., Abramova, N., Bratov, A., Villa, R., 2015. Effect of surface conductivity on the sensitivity of interdigitated impedimetric sensors and their design considerations. *Sens. Actuators B Chem.* 207, 1010–1018.
- Gutiérrez, D., Vandenhevel, D., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., García, P., 2015. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono-and dual-species staphylococcal biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3336–3348.
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E., 2005. Basic phage biology. *Bacteriophages Biol. Appl.* 4, 30–63.
- Haddad, P.A., Mah, T.-F., Mussivand, T., 2016. In Vitro Assessment of Electric Currents Increasing the Effectiveness of Vancomycin Against *S. taphylococcus epidermidis* Biofilms. *Artif. Organs* 40, 804–810.
- Hall, M.R., McGillicuddy, E., Kaplan, L.J., 2014. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. *Surg. Infect.* 15, 1–7.
- Hamilton, W.A., 2003. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19, 65–76.
- Hampton, H.G., Watson, B.N., Fineran, P.C., 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* 577, 327–336.
- Harper, D.R., Parracho, H.M., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., Morales, S., 2014. Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 3, 270–284.
- Hasan, S., Danishuddin, M., Khan, A.U., 2015. Inhibitory effect of zingiber officinale towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. *BMC Microbiol.* 15, 1–14.
- Heindl, J.E., Wang, Y., Heckel, B.C., Mohari, B., Feirer, N., Fuqua, C., 2014. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front. Plant Sci.* 5, 176.
- Hellio, C., Trepos, R., Aguila-Ramírez, R.N., Hernández-Guerrero, C.J., 2015. Protocol for assessing antifouling activities of macroalgal extracts, in: *Natural Products From Marine Algae*. Springer, pp. 421–435.
- Hellio, C., Yebra, D., 2009. *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Elsevier.
- Hendrix, R.W., 2002. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor. Popul. Biol.* 61, 471–480.
- Hensen, S.M., Pavičić, M., Lohuis, J., De Hoog, J.A.M., Poutrel, B., 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* 83, 1966–1975.

- Heredia-Ponce, Z., Gutiérrez-Barranquero, J.A., Purtschert-Montenegro, G., Eberl, L., Cazorla, F.M., de Vicente, A., 2020. Biological role of EPS from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 extracellular matrix, focusing on a Psl-like polysaccharide. *NPJ Biofilms Microbiomes* 6, 1–13.
- Høiby, N., 2017. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis* 125, 272–275.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Jensen, P.Ø., Kolpen, M., Qvist, T., Aanæs, K., Pressler, T., Skov, M., Ciofu, O., 2017. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *Apmis* 125, 339–343.
- Hotomi, M., Tabata, T., Kakiuchi, H., Kunimoto, M., 1993. Detection of Haemophilus influenzae in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 27, 119–126.
- Hou, J., Veeregowda, D.H., van de Belt-Gritter, B., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2018. Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in Staphylococcus aureus biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01516-17.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., Sullivan, M.B., 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* 11, 1511–1520.
- Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Ruzicka, F., Pilat, Z., Samek, O., 2018. Monitoring Candida parapsilosis and Staphylococcus epidermidis biofilms by a combination of scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Sensors* 18, 4089.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Crowley, J.R., Heuser, J., Chapman, M.R., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J.P., Hultgren, S.J., 2013. Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio* 4, e00645-13.
- Huttunen-Saarivirta, E., Rajala, P., Marja-aho, M., Maukonen, J., Sohlberg, E., Carpén, L., 2018. Ennoblement, corrosion, and biofouling in brackish seawater: Comparison between six stainless steel grades. *Bioelectrochemistry* 120, 27–42.
- Ingraham, J.L., 2010. March of the microbes: sighting the unseen. Harvard University Press.
- Irie, Y., Parsek, M.R., 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Bact. Biofilms* 67–84.
- Islam, N., Kim, Y., Ross, J.M., Marten, M.R., 2014. Proteomic analysis of Staphylococcus aureus biofilm cells grown under physiologically relevant fluid shear stress conditions. *Proteome Sci.* 12, 1–12.
- Ivleva, N.P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., Haisch, C., 2009. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 197–206.
- Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., 2004. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation.
- Jain, M.C., 2020. Planar microwave resonator sensor technology for real-time and contactless monitoring of microbial growth on solid media (PhD Thesis). UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (Okanagan).
- Jain, M.C., Nadaraja, A.V., Mohammadi, S., Vizcaino, B.M., Zarifi, M.H., 2021. Passive microwave biosensor for real-time monitoring of subsurface bacterial growth. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 15, 122–132.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81, 7–11.
- James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. deLancey, Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 16, 37–44.
- Johnsen, A.R., Hausner, M., Schnell, A., Wuertz, S., 2000. Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in Sphingomonas biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3487–3491.
- Jones, R.E., Simonetti, F., Lowe, M.J., Bradley, I.P., 2012. Use of microwaves for the detection of water as a cause of corrosion under insulation. *J. Nondestruct. Eval.* 31, 65–76.
- K Chan, B., T Abedon, S., 2015. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr. Pharm. Des.* 21, 85–99.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., Andrew, P.W., 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 288–301.
- Kalia, V.C., 2014. Microbes, antimicrobials and resistance: the battle goes on. *Indian J. Microbiol.*
- Kalia, V.C., 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol. Adv.* 31, 224–245.
- Kalia, V.C., Kumar, P., Pandian, S.T., Sharma, P., 2015. Biofouling control by quorum quenching, in: Springer Handbook of Marine Biotechnology. Springer, pp. 431–440.
- Kalia, V.C., Raju, S.C., Purohit, H.J., 2011. Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and-lactonase. *Open Microbiol. J.* 5, 1.
- Kalia, V.C., Wood, T.K., Kumar, P., 2014. Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microb. Ecol.* 68, 13–23.
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., Thurnheer, T., 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol.* 28, 668–681.
- Kassinger, S.J., Van Hoek, M.L., 2020. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synth. Syst. Biotechnol.* 5, 1–10.
- Keen, E.C., 2015. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays* 37, 6–9.
- Kennedy, E., Nelson, E.M., Tanaka, T., Damiano, J., Timp, G., 2016. Live bacterial physiology visualized with 5 nm resolution using scanning transmission electron microscopy. *ACS Nano* 10, 2669–2677.
- Kerekes, E.B., Vidács, A., Takó, M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., Horváth, G., Balázs, V.L., Krisch, J., 2019. Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono-and polymicrobial bacterial cultures. *Microorganisms* 7, 345.

- Khatoon, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E.J., Mah, T.-F., Alarcon, E.I., 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4, e01067.
- Kim, E.R., Chang, D.K., 2014. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 9872.
- Kim, N.Y., Dhakal, R., Adhikari, K.K., Kim, E.S., Wang, C., 2015. A reusable robust radio frequency biosensor using microwave resonator by integrated passive device technology for quantitative detection of glucose level. *Biosens. Bioelectron.* 67, 687–693.
- Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 740–755.
- Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E., 2019. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 219–232.
- Koul, S., Prakash, J., Mishra, A., Kalia, V.C., 2016. Potential emergence of multi-quorum sensing inhibitor resistant (MQSIR) bacteria. *Indian J. Microbiol.* 56, 1–18.
- Kowalski, C.H., Morelli, K.A., Schultz, D., Nadell, C.D., Cramer, R.A., 2020. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 22473–22483.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A., 2004. Bacteriophages: biology and applications. Crc press.
- Lacoste, E., Gaertner-Mazouni, N., 2015. Biofouling impact on production and ecosystem functioning: a review for bivalve aquaculture. *Rev. Aquac.* 7, 187–196.
- Laj, N., Elayadeth-Meethal, M., Huxley, V. A. J., Hussain, R. R., Kuruniyan, M. S., & Naseef, P. P. (2022). Quorum-sensing molecules: Sampling, identification and characterization of N-acyl-homoserine lactone in *Vibrio* sp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2733-2737.
- Lajhar, S.A., Brownlie, J., Barlow, R., 2018. Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia. *BMC Microbiol.* 18, 1–15.
- Lanter, B.B., Sauer, K., Davies, D.G., 2014. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio* 5, e01206-14.
- Lehman, S.M., Donlan, R.M., 2015. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1127–1137.
- Letham, S.C., Bharat, T.A., 2020. Illuminating the dynamics of biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 544–544.
- Li, J., Bishop, P.L., 2004. Time course observations of nitrifying biofilm development using microelectrodes. *J. Environ. Eng. Sci.* 3, 523–528.
- Li J, Busscher HJ, Norde W, Sjollem J. Analysis of the contribution of sedimentation to bacterial mass transport in a parallel plate flow chamber. *Colloids Surf Biointerfaces* 2011;84:76–81.
- Li, S., Renick, P., Senkowsky, J., Nair, A., Tang, L., 2021. Diagnostics for wound infections. *Adv. Wound Care* 10, 317–327.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., Nikaido, H., 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 337–418.
- Li, Y.-H., Tian, X., 2012. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12, 2519–2538.
- Liebe, H.J., Hufford, G.A., Manabe, T., 1991. A model for the complex permittivity of water at frequencies below 1 THz. *Int. J. Infrared Millim. Waves* 12, 659–675.
- Lin, D.M., Koskella, B., Lin, H.C., 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 8, 162.
- Liu, L., Xu, Y., Cui, F., Xia, Y., Chen, L., Mou, X., Lv, J., 2018. Monitoring of bacteria biofilms forming process by in-situ impedimetric biosensor chip. *Biosens. Bioelectron.* 112, 86–92.
- Liu, L.-L., Wu, C.-H., Qian, P.-Y., 2020. Marine natural products as antifouling molecules—a mini-review (2014–2020). *Biofouling* 36, 1210–1226.
- Liu, W., Russel, J., Röder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M., Sørensen, S.J., 2017. Low-abundant species facilitates specific spatial organization that promotes multispecies biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 19, 2893–2905.
- Loc-Carrillo, C., Abedon, S.T., 2011. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1, 111–114.
- Lohumi, S., Kim, M.S., Qin, J., Cho, B.-K., 2017. Raman imaging from microscopy to macroscopy: quality and safety control of biological materials. *TrAC Trends Anal. Chem.* 93, 183–198.
- Lu, T.K., Collins, J.J., 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11197–11202.
- Lyon, G.J., Muir, T.W., 2003. Chemical signaling among bacteria and its inhibition. *Chem. Biol.* 10, 1007–1021.
- Machado, D., Castro, J., Palmeira-de-Oliveira, A., Martinez-de-Oliveira, J., Cerca, N., 2016. Bacterial vaginosis biofilms: challenges to current therapies and emerging solutions. *Front. Microbiol.* 6, 1528.
- Madsen, J.S., Sørensen, S.J., Burmølle, M., 2018. Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Curr. Opin. Microbiol.* 42, 104–109.
- Magalhães, A.P., França, Â., Pereira, M.O., Cerca, N., 2019. RNA-based qPCR as a tool to quantify and to characterize dual-species biofilms. *Sci. Rep.* 9, 1–12.
- Maina, I.W., Patel, N.N., Cohen, N.A., 2018. Understanding the role of biofilms and superantigens in chronic rhinosinusitis. *Curr. Otorhinolaryngol. Rep.* 6, 253–262.
- Makwana, M., Grover, C.R., Kumar, N., 2018. Biocides resistance profiles of biofilm forming bacteria of dairy niche and their control. *J. Homepage Httpwww Ijcmasc* 7, 2018.

- Manning, A.J., Kuehn, M.J., 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11, 1–15.
- Manz, B., Volke, F., Goll, D., Horn, H., 2003. Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with magnetic resonance imaging (MRI). *Biotechnol. Bioeng.* 84, 424–432.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofo, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., Rhodes, J.M., 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127, 80–93.
- Marty, F., Gueuné, H., Malard, E., Sánchez-Amaya, J.M., Sjögren, L., Abbas, B., Quillet, L., van Loosdrecht, M.C., Muyzer, G., 2014. Identification of key factors in accelerated low water corrosion through experimental simulation of tidal conditions: influence of stimulated indigenous microbiota. *Biofouling* 30, 281–297.
- Mason, A., Soprani, M., Korostynska, O., Amirthalingam, A., Cullen, J., Muradov, M., Carmona, E.N., Sberveglieri, G., Sberveglieri, V., Al-Shamma'a, A., 2018. Real-time microwave, dielectric, and optical sensing of lincomycin and tylosin antibiotics in water: Sensor fusion for environmental safety. *J. Sens.* 2018.
- Melchers, R.E., Jeffrey, R.J., 2013. Accelerated low water corrosion of steel piling in harbours. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 48, 496–505.
- Melo, L.D., Veiga, P., Cerca, N., Kropinski, A.M., Almeida, C., Azeredo, J., Sillankorva, S., 2016. Development of a phage cocktail to control *Proteus mirabilis* catheter-associated urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 7, 1024.
- Mitchell, C.M., Haick, A., Nkwopara, E., Garcia, R., Rendi, M., Agnew, K., Fredricks, D.N., Eschenbach, D., 2015. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212, 611-e1.
- Miyoshi-Akiyama, T., Tada, T., Ohmagari, N., Viet Hung, N., Tharavichitkul, P., Pokhrel, B.M., Gniadkowski, M., Shimojima, M., Kirikae, T., 2017. Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol. Evol.* 9, 3238–3245.
- Mizoi, K., Rodríguez-González, V., Sasaki, M., Suzuki, S., Honda, K., Ishida, N., Suzuki, N., Kuchitsu, K., Kondo, T., Yuasa, M., 2022. Interactions between pH, reactive species, and cells in plasma-activated water can remove algae. *RSC Adv.* 12, 7626–7634.
- Møller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M., Molin, S., 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 721–732.
- Monasta, L., Ronfani, L., Marchetti, F., Montico, M., Vecchi Brumatti, L., Bavcar, A., Grasso, D., Barbiero, C., Tamburlini, G., 2012. Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. *PloS One* 7, e36226.
- Monteiro, R., Pires, D.P., Costa, A.R., Azeredo, J., 2019. Phage therapy: going temperate? *Trends Microbiol.* 27, 368–378.
- Montgomery, M.T., Guerrero Bustamante, C.A., Dedrick, R.M., Jacobs-Sera, D., Hatfull, G.F., 2019. Yet more evidence of collusion: a new viral defense system encoded by *Gordonia* phage CarolAnn. *MBio* 10, e02417-18.
- Moolat, R., Mani, M., Pezhohil, M., 2022. Asymmetric coplanar strip based stepped monopole sensor for liquid permittivity measurements. *Eng. Sci. Technol. Int. J.* 32, 101063.
- Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., Barral-Fraga, L., 2016. Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms. *Aquat. Biofilms Ecol. Water Qual. Wastewater Treat. Caister Acad. Press Norfolk UK.*
- Moreira JMR, Araújo JDP, Miranda JM, Simões M, Melo LF, Mergulhão FJ. The effects of surface properties on *Escherichia coli* adhesion are modulated by shear stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;123:1–7.
- Moreno, I., Franasiak, J.M., 2017. Endometrial microbiota—new player in town. *Fertil. Steril.* 108, 32–39.
- Moura, V., Ribeiro, I., Moriggi, P., Capão, A., Salles, C., Bitati, S., Procópio, L., 2018. The influence of surface microbial diversity and succession on microbiologically influenced corrosion of steel in a simulated marine environment. *Arch. Microbiol.* 200, 1447–1456.
- Myszka, K., Czaczyk, K., 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces—a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61.
- Nakouti, I., Korostynska, O., Mason, A., Al-Shamma'a, A.I., 2020. Detection of pathogenic bacteria in aqueous media: assessing the potential of real-time electromagnetic wave sensing. *Int. J. Smart Sens. Intell. Syst.* 7.
- Napotnik, T.B., Miklavčič, D., 2018. In vitro electroporation detection methods—An overview. *Bioelectrochemistry* 120, 166–182.
- Narang, R., Mohammadi, S., Ashani, M.M., Sadabadi, H., Hejazi, H., Zarifi, M.H., Sanati-Nezhad, A., 2018. Sensitive, real-time and non-intrusive detection of concentration and growth of pathogenic bacteria using microfluidic-microwave ring resonator biosensor. *Sci. Rep.* 8, 1–10.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A., 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 252–275.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313–322.
- Nelson, D.C., 2013. Rapid dispersion of polymicrobial wound biofilms with depolymerase enzymes. *MARYLAND UNIV COLLEGE PARK.*
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2015. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* 23, 233–242.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2014a. Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy, in: *Microbial Biofilms*. Springer, pp. 43–64.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2014b. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Product. Biofilms* 1–51.

- Ngo, C.C., Massa, H.M., Thornton, R.B., Cripps, A.W., 2016. Predominant bacteria detected from the middle ear fluid of children experiencing otitis media: a systematic review. *PloS One* 11, e0150949.
- Nishitani, K., Sutipornpalangkul, W., de Mesy Bentley, K.L., Varrone, J.J., Bello-Irizarry, S.N., Ito, H., Matsuda, S., Kates, S.L., Daiss, J.L., Schwarz, E.M., 2015. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J. Orthop. Res.* 33, 1311–1319.
- Olsen, N.M., Thiran, E., Hasler, T., Vanzielegem, T., Belibasakis, G.N., Mahillon, J., Loessner, M.J., Schmelcher, M., 2018. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. *Viruses* 10, 438.
- Omer, A. E., Shaker, G., Safavi-Naeini, S., Kokabi, H., Alquié, G., Deshours, F., & Shubair, R. M. (2020). Low-cost portable microwave sensor for non-invasive monitoring of blood glucose level: Novel design utilizing a four-cell CSRR hexagonal configuration. *Scientific Reports*, 10(1), 1-20.
- Oppenheim, A.B., Kobiler, O., Stavans, J., Court, D.L., Adhya, S., 2005. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 409–429.
- Organization, W.H., 2019. 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- Otto, M., 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188.
- Otto, M., 2008. Staphylococcal biofilms. *Bact. Biofilms* 207–228.
- Ozturk, T., 2019. Characterization of liquids using electrical properties in microwave and millimeter wave frequency bands. *J. Nondestruct. Eval.* 38, 1–9.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 577–588.
- Park, J., Lee, Y., Hwang, Y., Cho, S., 2020. Interdigitated and wave-shaped electrode-based capacitance sensor for monitoring antibiotic effects. *Sensors* 20, 5237.
- Passos da Silva, D., Schofield, M.C., Parsek, M.R., Tseng, B.S., 2017. An update on the sociomicrobiology of quorum sensing in gram-negative biofilm development. *Pathogens* 6, 51.
- Pavanello, G., Faimali, M., Pittore, M., Mollica, Angelo, Mollica, Alessandro, Mollica, Alfonso, 2011. Exploiting a new electrochemical sensor for biofilm monitoring and water treatment optimization. *Water Res.* 45, 1651–1658.
- Pen, Y., Zhang, Z.J., Morales-García, A.L., Mears, M., Tarmey, D.S., Edyvean, R.G., Banwart, S.A., Geoghegan, M., 2015. Effect of extracellular polymeric substances on the mechanical properties of *Rhodococcus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 1848, 518–526.
- Percival, S.L., Hill, K.E., Williams, D.W., Hooper, S.J., Thomas, D.W., Costerton, J.W., 2012. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 20, 647–657.
- Perez-Tanoira, R., Aarnisalo, A., Haapaniemi, A., Saarinen, R., Kuusela, P., Kinnari, T.J., 2019. Bacterial biofilm in salivary stones. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 276, 1815–1822.
- Pinto, R.M., Soares, F.A., Reis, S., Nunes, C., Van Dijk, P., 2020. Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Front. Microbiol.* 11, 952.
- Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D., Sillankorva, S., Azeredo, J., 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2141–2151.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N., Stewart, P.S., 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* 54, 269–276.
- Plusa, T., 2019. The importance of biofilm in the context of increasing bacterial resistance to antibiotics. *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* 47, 197–202.
- Pokharel, K., Dawadi, B.R., Bhatt, C.P., Gupte, S., 2019. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and its antibiotic sensitivity pattern. *J. Nepal Health Res. Coun.* 17, 109–113.
- Poma, N., Vivaldi, F., Bonini, A., Salvo, P., Kirchhain, A., Melai, B., Bottai, D., Tavanti, A., Di Francesco, F., 2020. A graphenic and potentiometric sensor for monitoring the growth of bacterial biofilms. *Sens. Actuators B Chem.* 323, 128662.
- Pournajaf, A., Razavi, S., Irajian, G., Ardebili, A., Erfani, Y., Solgi, S., Yaghoubi, S., Rasaeian, A., Yahyapour, Y., Kafshgari, R., 2018. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infez Med* 26, 226–36.
- Pousti, M., Zarabadi, M.P., Amirdehi, M.A., Paquet-Mercier, F., Greener, J., 2019. Microfluidic bioanalytical flow cells for biofilm studies: a review. *Analyst* 144, 68–86.
- Qayyum, S., Sharma, D., Bisht, D., Khan, A.U., 2016. Protein translation machinery holds a key for transition of planktonic cells to biofilm state in *Enterococcus faecalis*: a proteomic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 652–659.
- Qiang, T., Wang, C., Kim, N.-Y., 2017. Quantitative detection of glucose level based on radiofrequency patch biosensor combined with volume-fixed structures. *Biosens. Bioelectron.* 98, 357–363.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O., 2015a. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 7, 647–671.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O., 2015b. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* 7, 493–512.

- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., 2015. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Res. Int.* 2015.
- Rathsam, C., Eaton, R.E., Simpson, C.L., Browne, G.V., Valova, V.A., Harty, D.W., Jacques, N.A., 2005. Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoretic Analysis of *Streptococcus mutans* Biofilms. *J. Proteome Res.* 4, 2161–2173.
- Reichhardt, C., Parsek, M.R., 2019. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front. Microbiol.* 10, 677.
- Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36, 347–355.
- Revsbech, N.P., 2021. Simple sensors that work in diverse natural environments: The micro-Clark sensor and biosensor family. *Sens. Actuators B Chem.* 329, 129168.
- Reyes-Robles, T., Dillard, R.S., Cairns, L.S., Silva-Valenzuela, C.A., Housman, M., Ali, A., Wright, E.R., Camilli, A., 2018. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 200, e00792-17.
- Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878–881.
- Richards, C., Barrett, A., Maguire, I., Kwiatkowska, S., Regan, F., 2019. Marine Inspired textured materials for reduction of biofouling on surfaces, in: OCEANS 2019-Marseille. IEEE, pp. 1–8.
- Richter, K., Schicklberger, M., Gescher, J., 2012. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 913–921.
- Rincon, S.M., Urrego, N.F., Avila, K.J., Romero, H.M., Beyenal, H., 2019. Photosynthetic activity assessment in mixotrophically cultured *Chlorella vulgaris* biofilms at various developmental stages. *Algal Res.* 38, 101408.
- Rodrigues, D., Bañobre-López, M., Espiña, B., Rivas, J., Azeredo, J., 2013. Effect of magnetic hyperthermia on the structure of biofilm and cellular viability of a food spoilage bacterium. *Biofouling* 29, 1225–1232.
- Romeo, T., Gong, M.I.N., Liu, M.Y., Brun-Zinkernagel, A.-M., 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* 175, 4744–4755.
- Rosen, D.A., Hooton, T.M., Stamm, W.E., Humphrey, P.A., Hultgren, S.J., 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 4, e329.
- Ross, A., Ward, S., Hyman, P., 2016. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Front. Microbiol.* 7, 1352.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., Tiwari, V., 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9, 522–554.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a012427.
- Ruvio, G., Vaselli, M., Lopresto, V., Pinto, R., Farina, L., & Cavagnaro, M. (2018). Comparison of different methods for dielectric properties measurements in liquid sample media. *International Journal of RF and Microwave Computer-Aided Engineering*, 28(3), e21215.
- Saber, N., Ju, Y., Hsu, H.-Y., Lee, S.-H., 2013. A feasibility study on the application of microwaves for online biofilm monitoring in the pipelines. *Int. J. Press. Vessels Pip.* 111, 99–105.
- Salmond, G.P., Fineran, P.C., 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 777–786.
- Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., Briand, J.-F., 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893.
- Samson, J.É., Magadán, A.H., Sabri, M., Moineau, S., 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 675–687.
- Sánchez-Lozano, I., Hernández-Guerrero, C.J., Muñoz-Ochoa, M., Hellio, C., 2019. Biomimetic approaches for the development of new antifouling solutions: Study of incorporation of macroalgae and sponge extracts for the development of new environmentally-friendly coatings. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4863.
- Sanchez-Vizueté, P., Le Coq, D., Bridier, A., Herry, J.-M., Aymerich, S., Briandet, R., 2015. Identification of *ypqP* as a new *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 109–118.
- Sandt, C., Smith-Palmer, T., Pink, J., Brennan, L., Pink, D., 2007. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1808–1820.
- Sandvik, E.L., McLeod, B.R., Parker, A.E., Stewart, P.S., 2013. Direct electric current treatment under physiologic saline conditions kills *Staphylococcus epidermidis* biofilms via electrolytic generation of hypochlorous acid. *PloS One* 8, e55118.
- Sarrazfadeh, M.H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J.M., Ghommidh, C., 2005. Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 27, 511–517.
- Satheesh, S., Ba-akdah, M.A., Al-Sofyani, A.A., 2016. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms—A review. *Electron. J. Biotechnol.* 21, 26–35.
- Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 56–66.
- Sawada, S., Okutani, F., Kobayashi, T., 2019. Comprehensive detection of respiratory bacterial and viral pathogens in the middle ear fluid and nasopharynx of pediatric patients with acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 1199–1203.
- Schilder, A.G., Chonmaitree, T., Cripps, A.W., Rosenfeld, R.M., Casselbrant, M.L., Haggard, M.P., Venekamp, R.P., 2016. Otitis media. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 1–18.
- Schmerer, M., Molineux, I.J., Bull, J.J., 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ* 2, e590.

- Schrott, G.D., Bonanni, P.S., Busalmen, J.P., 2019. Open circuit potentiometry reports on internal redox states of cells in *G. Sulfurreducens* biofilms. *Electrochimica Acta* 303, 176–182.
- Seymour, G.J., Ford, P.J., Cullinan, M.P., Leishman, S., Yamazaki, K., 2007. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 3–10.
- Sharp, R., 2001. Bacteriophages: biology and history. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 667–672.
- Shukla, S.K., Rao, T.S., 2017. An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. *Biorxiv* 100214.
- Silpe, J.E., Bassler, B.L., 2019. A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision. *Cell* 176, 268–280.
- Sim, S.T.V., Suwarno, S.R., Chong, T.H., Krantz, W.B., Fane, A.G., 2013. Monitoring membrane biofouling via ultrasonic time-domain reflectometry enhanced by silica dosing. *J. Membr. Sci.* 428, 24–37.
- Simmons, M., Drescher, K., Nadell, C.D., Bucci, V., 2018. Phage mobility is a core determinant of phage–bacteria coexistence in biofilms. *ISME J.* 12, 531–543.
- Sklavounos, A.H., Barker, N.S., 2014. Liquid-permittivity measurements using a rigorously modeled overmoded cavity resonator. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 62, 1363–1372.
- Snow, D.E., Everett, J., Mayer, G., Cox, S.B., Miller, B., Rumbaugh, K., Wolcott, R.A., Wolcott, R.D., 2016. The presence of biofilm structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. *J. Wound Care* 25, S16–S22.
- Song, J., Li, Y., Ke, D., Wang, D., Zhang, X.-E., 2022. In situ graphene-modified carbon microelectrode array biosensor for biofilm impedance analysis. *Electrochimica Acta* 403, 139570.
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í. B., Duarte, F. A., & Pinho, G. L. L. (2017). Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?. *Journal of hazardous materials*, 330, 76-82.
- Spratt, B.G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264, 388–393.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet* 358, 135–138.
- Stoner, S.N., Baty, J.J., Scoffield, J.A., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* polysaccharide Psl supports airway microbial community development. *ISME J.* 1–10.
- Streeter, K., Katouli, M., 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment.
- Subhadra, B., Kim, D.H., Woo, K., Surendran, S., Choi, C.H., 2018. Control of biofilm formation in healthcare: Recent advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. *Materials* 11, 1676.
- Subramanian, S., Gerasopoulos, K., Guo, M., Sintim, H.O., Bentley, W.E., Ghodssi, R., 2016. Autoinducer-2 analogs and electric fields—an antibiotic-free bacterial biofilm combination treatment. *Biomed. Microdevices* 18, 1–12.
- Sun, L., Liao, K., Wang, D., 2015. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PloS One* 10, e0117695.
- Sun, X., Zhang, J., 2021. Bacterial exopolysaccharides: Chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 173, 481–490.
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9.
- Svenningsen, S.L., 2018. Small RNA-based regulation of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Microbiol. Spectr.* 6, 6–4.
- Sweere, J.M., Ishak, H., Sunkari, V., Bach, M.S., Manasherob, R., Yadava, K., Ruppert, S.M., Sen, C.K., Balaji, S., Keswani, S.G., 2020. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* wound infection in immunocompetent mice. *Adv. Wound Care* 9, 35–47.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Herber, A., 2009. Mucosal flora in Crohn’s disease and ulcerative colitis—an overview. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60, 61–71.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., Lochs, H., 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3380–3389.
- Tan, D., Dahl, A., Middelboe, M., 2015. Vibriophages differentially influence biofilm formation by *Vibrio anguillarum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4489–4497.
- Tavernier, S., Coenye, T., 2015. Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in multispecies biofilms using PMA-qPCR. *PeerJ* 3, e787.
- Taylor, B.P., Penington, C.J., Weitz, J.S., 2017. Emergence of increased frequency and severity of multiple infections by viruses due to spatial clustering of hosts. *Phys. Biol.* 13, 066014.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., Horswill, A.R., 2011. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem. Rev.* 111, 117–151.
- Tian, L., Yin, Y., Bing, W., & Jin, E. (2021). Antifouling technology trends in marine environmental protection. *Journal of Bionic Engineering*, 18(2), 239-263.
- Tomazinho, F.S.F., Sousa-Neto, M.D. de, Pécora, J.D., Lamon, A.W., Gonzalez, B.C., Silva-Sousa, Y.T.C., 2015. Use of a dissolved oxygen microsensor for assessing the viability and thickness of microbial biofilm on root surfaces. *Int. Endod. J.* 48, 469–477.
- Trinh, J.T., Székely, T., Shao, Q., Balázs, G., Zeng, L., 2017. Cell fate decisions emerge as phages cooperate or compete inside their host. *Nat. Commun.* 8, 1–13.
- Twort, F.W., 1961. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Acta Kravsi.*
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R.C., Arenas, J., 2020. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics* 10, 3.

- Varshney, M., Li, Y., 2009. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2951–2960.
- Verderosa, A.D., Totsika, M., Fairfull-Smith, K.E., 2019. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Front. Chem.* 824.
- Vogt, S.J., Sanderlin, A.B., Seymour, J.D., Codd, S.L., 2013. Permeability of a growing biofilm in a porous media fluid flow analyzed by magnetic resonance displacement-relaxation correlations. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 1366–1375.
- Wagih, M., Shi, J., 2021. Wireless ice detection and monitoring using flexible UHF RFID tags. *IEEE Sens. J.* 21, 18715–18724.
- Wagner, S., Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R.W., Empting, M., Titz, A., 2016. Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Med. Chem.* 59, 5929–5969.
- Wang, C., Zhang, H., Wang, J., Chen, S., Wang, Z., Zhao, L., Wang, X., 2020. Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability. *Microbiol. Res.* 239, 126527.
- Wang, J., Liu, Q., Dong, D., Hu, H., Wu, B., Ren, H., 2021. AHLs-mediated quorum sensing threshold and its response towards initial adhesion of wastewater biofilms. *Water Res.* 194, 116925.
- Wang, J., Liu, Q., Li, X., Ma, S., Hu, H., Wu, B., Zhang, X., Ren, H., 2020. In-situ monitoring AHL-mediated quorum-sensing regulation of the initial phase of wastewater biofilm formation. *Environ. Int.* 135, 105326.
- Wang, J., Lv, M., Du, M., Li, Z., Xu, T., Li, G., 2022. Effects of cathodic polarization on X65 steel inhibition behavior and mechanism of mixed microorganisms induced corrosion in seawater. *Corros. Sci.* 110670.
- Wang, J., Ren, H., Li, X., Li, J., Ding, L., Geng, J., Xu, K., Huang, H., Hu, H., 2018. In situ monitoring of wastewater biofilm formation process via ultrasonic time domain reflectometry (UTDR). *Chem. Eng. J.* 334, 2134–2141.
- Watanabe, K., Manfield, M., Lee, M., Kouzuma, A., 2009. Electron shuttles in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 633–641.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346.
- Wei, Y., Jiao, Y., An, D., Li, D., Li, W., Wei, Q., 2019. Review of dissolved oxygen detection technology: From laboratory analysis to online intelligent detection. *Sensors* 19, 3995.
- Weidner, W., Schiefer, H.G., Jantos, C., Krauss, H., Friedrich, H.J., Altmannsberger, M., 1991. Chronic prostatitis: a thorough search for etiologically involved microorganisms in 1,461 patients. *Infection* 19, S119–S125.
- Whiteley, M., Diggle, S.P., Greenberg, E.P., 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320.
- Wickramasinghe, N.N., Hlaing, M.M., Ravensdale, J.T., Coorey, R., Chandry, P.S., Dykes, G.A., 2020. Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. *Sci. Rep.* 10, 1–16.
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T.D., Wilson, E., 2017. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. *Res. Rev. J. Eng. Technol.* 6.
- Wilson, D.N., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., O'Neill, A.J., 2020. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 637–648.
- Wolfbeis, O.S., 2015. Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode. *BioEssays* 37, 921–928.
- Wood, T.K., Knabel, S.J., Kwan, B.W., 2013. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7116–7121.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., Song, Z.-J., 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7.
- Wu, Y., Klapper, I., Stewart, P.S., 2018. Hypoxia arising from concerted oxygen consumption by neutrophils and microorganisms in biofilms. *Pathog. Dis.* 76, fty043.
- Yang, L., Bashir, R., 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol. Adv.* 26, 135–150.
- Yarmush, M.L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T., Miklavčič, D., 2014. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16, 295–320.
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50, 75–104.
- Yi, Y., Zhao, T., Xie, B., Zang, Y., Liu, H., 2020. Dual detection of biochemical oxygen demand and nitrate in water based on bidirectional *Shewanella loihica* electron transfer. *Bioresour. Technol.* 309, 123402.
- Yoon, B.I., Kim, S., Han, D.-S., Ha, U.-S., Lee, S.-J., Kim, H.W., Han, C.-H., Cho, Y.-H., 2012. Acute bacterial prostatitis: how to prevent and manage chronic infection? *J. Infect. Chemother.* 18, 444–450.
- Zarabadi, M.P., Charette, S.J., Greener, J., 2019. Toggling *Geobacter sulfurreducens* metabolic state reveals hidden behaviour and expanded applicability to sustainable energy applications. *Sustain. Energy Fuels* 3, 2211–2217.
- Zarabadi, M.P., Paquet-Mercier, F., Charette, S.J., Greener, J., 2017. Hydrodynamic effects on biofilms at the biointerface using a microfluidic electrochemical cell: case study of *Pseudomonas* sp. *Langmuir* 33, 2041–2049.
- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Qi, W., Wang, F., Zhou, Y., 2018. Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems. *Chemosphere* 203, 368–380.
- Zhang, X.-Y., Sun, K., Abulimiti, A., Xu, P.-P., Li, Z.-Y., 2019. Microfluidic system for observation of bacterial culture and effects on biofilm formation at microscale. *Micromachines* 10, 606.
- Zhao, J., Quan, C., Jin, L., Chen, M., 2018. Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria. *J. Biotechnol.* 268, 53–60.

CHAPITRE II

Une méthode radiofréquence pour suivre la formation d'un biofilm en temps réel

I.	INTRODUCTION	90
II.	MATERIEL ET METHODES	92
1.	SELECTION DE DEUX MODELES BACTERIENS POUR LA CONCEPTION D'UN CAPTEUR RADIOFREQUENCE.....	92
1.1.	<i>Vibrio natriegens : un modèle biotechnologique industriel</i>	<i>92</i>
1.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa : un modèle d'intérêt médical</i>	<i>93</i>
1.3.	<i>Cultures bactériennes.....</i>	<i>94</i>
2.	ELABORATION D'UN MODELE SIMPLIFIE POUR LA CONCEPTION DU CAPTEUR	95
2.1.	<i>Préparation d'échantillons représentatifs d'un biofilm</i>	<i>95</i>
2.2.	<i>Etude fondamentale des propriétés diélectriques des biofilms.....</i>	<i>96</i>
2.3.	<i>Conception du capteur radiofréquence : architecture et matériaux</i>	<i>99</i>
2.4.	<i>Préparation du capteur pour des mesures biologiques</i>	<i>101</i>
2.5.	<i>Analyses statistiques</i>	<i>101</i>
III.	ETUDES PRELIMINAIRES ET VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	102
1.	ANALYSES DE LA PERMITTIVITE DIELECTRIQUE.....	102
2.	VALIDATION DE LA SONDE HYPERFREQUENCE	107
2.1.	<i>Obtention du coefficient de réflexion S_{11}.....</i>	<i>107</i>
2.2.	<i>Détermination de la gamme fréquentielle des mesures.....</i>	<i>107</i>
IV.	MODELISATION NUMERIQUE.....	110
1.	CARTOGRAPHIE DES CHAMPS ELECTRIQUES EMIS.....	110
2.	DISTANCE D'IMMERSION DE LA SONDE	112
3.	EFFET DE LA PERMITTIVITE ELECTRIQUE ET DE LA CONDUCTIVITE.....	113
4.	SIMULATION DE LA CROISSANCE D'UN BIOFILM	115
5.	BILAN DES SIMULATIONS NUMERIQUES.....	118
V.	APPLICATION DU CAPTEUR SUR DES CAS REELS.....	119
VI.	CONCLUSIONS	126
	REFERENCES	127

I. INTRODUCTION

Les connaissances acquises sur les biofilms, synthétisées dans le chapitre précédent, ont apporté une bonne compréhension des processus biologiques impliqués dans leur développement et leurs conséquences sur l'environnement. Une partie des investigations repose sur l'élaboration de nouvelles techniques de détection des biofilms. En quelques décennies, le domaine des capteurs dédiés aux matériaux biologiques a connu une croissance significative en raison d'un besoin grandissant de prévenir l'apparition de pathogènes et leurs impacts sur la santé, l'économie et l'écologie mondiale (Whitesides, 2006). En conséquence, divers capteurs basés principalement sur la détection optique, mécanique ou électrique à basse fréquence sont disponibles pour la caractérisation et la quantification des échantillons biologiques. Ils sont efficaces, mais présentent cependant des inconvénients considérables, tels que l'utilisation de marqueurs optiques pouvant altérer la véritable fonction biologique, une faible sensibilité en milieu liquide, et un encombrement important. Néanmoins, l'utilisation d'ondes électromagnétiques pour caractériser et étudier les propriétés diélectriques de substances biologiques telles que les tissus et les suspensions cellulaires est bien établie notamment grâce aux travaux de Schwan et Stuchly (Schwan, 1983; Stuchly *et al.*, 1982). La miniaturisation des dispositifs a permis l'élaboration de nouveaux outils plus appropriés pour l'analyse biologique et les manipulations d'agents biologiques. Ces dernières années, l'idée de développer des biocapteurs basés sur la détection à haute fréquence (HF) au-delà du gigahertz pour la caractérisation biologique a fait son apparition (Martellosio *et al.*, 2016; Haase *et al.*, 2015). En effet, l'utilisation de la HF offre des avantages importants :

- Une solution non invasive et sans contact, sans aucune exigence de marqueurs ou autres modifications
- Des mesures particulièrement rapides et des caractérisations précises, ainsi qu'un suivi en temps réel sur une grande échelle de temps
- Une compatibilité avec les environnements biologiques, en plus de la possibilité de caractériser de très petits volumes (parfois quelques microlitres).

La combinaison de liquides et d'ondes électromagnétiques peut être utilisée pour la caractérisation de solvants et de liquides standards, tels que l'eau purifiée ou l'éthanol absolu (Mohd Bahar *et al.*, 2019). Cependant, les publications impliquant à la fois de la matière biologique et des signaux micro-ondes sont rares. Parmi elles, les travaux de Grenier *et al.* (2009) présentent une technique innovante de détection biologique à des fréquences supérieures à 1 GHz où le capteur présenté tire parti d'un champ électromagnétique millimétrique, permettant la

caractérisation électrique de cellules humaines. Il faut souligner que le caractère sans contact de la détection est particulièrement adapté à l'analyse biologique puisqu'il permet de conserver l'intégrité de l'environnement biologique.

Les exemples de matériaux caractérisés à l'aide de méthodes hyperfréquences comprennent, entre autres, les tissus biologiques (Gun *et al.*, 2017), les tumeurs (Kuwahara *et al.*, 2019), les mélanges binaires de liquides (Peltonen *et al.*, 2018), les suspensions et émulsions de particules (Ojinnaka *et al.*, 2016), les aliments (Raju *et al.*, 2020), la végétation (Mavrovic *et al.*, 2018) et les sédiments marins (Mansour *et al.*, 2020). En tant que méthode polyvalente permettant de mesurer la permittivité diélectrique des matériaux, la sonde coaxiale à extrémité ouverte a quant à elle été largement utilisée par les chercheurs dans de nombreuses disciplines (Bobowski & Johnson, 2020; Hussein *et al.*, 2019; Mavrovic *et al.*, 2018). Les avantages de la sonde coaxiale par rapport aux autres techniques reposent sur une mesure à large bande (10^5 - 10^{10} Hz), aucune préparation de l'échantillon et convient aux échantillons liquides et semi-solides (Mansour *et al.*, 2020). Bien que les propriétés électriques de divers matériaux biologiques aient été étudiées pendant plusieurs décennies, une compréhension complète des mécanismes microscopiques conduisant aux dispersions diélectriques observées n'a pas encore été atteinte. En effet, ces mécanismes sont généralement modélisés à l'aide de résultats empiriques. Les études qui permettent d'approfondir les connaissances de ces mécanismes sont donc d'un intérêt fondamental.

De ces constats a émergé la motivation de développer un nouveau type de capteur radiofréquence. Ainsi, les objectifs de cette thèse sont basés sur le besoin de détecter la formation des biofilms à un stade précoce. Le bénéfice attendu de ces travaux serait également d'offrir une alternative aux méthodes existantes pour étudier les biofilms tout en étant complémentaire des techniques actuelles. Ce chapitre présente l'élaboration d'un capteur de biofilm dans le domaine des radiofréquences, ainsi que ses caractéristiques et son fonctionnement. Dans un premier temps, les caractéristiques électriques intrinsèques des constituants des biofilms seront examinées. Ensuite, l'architecture et la géométrie du capteur sont exposées. Elles ont été conçues de manière à ce qu'il fonctionne dans des conditions de laboratoire contrôlées mais également afin qu'il soit transposable à un environnement industriel ou naturel. Dans un troisième temps, un modèle numérique construit à partir du logiciel HFSS (High Frequency Structure Simulator) est proposé afin de compléter la compréhension du fonctionnement du capteur. Enfin, des tests en conditions de laboratoire avec des biofilms réels sont présentés et une discussion est proposée autour de ces résultats.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Sélection de deux modèles bactériens pour la conception d'un capteur radiofréquence

1.1. *Vibrio natriegens* : un modèle biotechnologique industriel

Vibrio natriegens a récemment été étudiée en tant qu'hôte pour la conception de biotechnologies en raison de ses propriétés intrinsèques prometteuses (taux de croissance élevé et taux de consommation de substrat spécifique à la biomasse) (Hoffart *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016). C'est également une bactérie couramment rencontrée dans les biofilms marins. Bien que la première souche de *V. natriegens* à croissance rapide ait été découverte en 1958 (Payne, 1958), il a fallu attendre près de 60 ans avant que plusieurs groupes de recherche reconnaissent indépendamment son potentiel et commencent à l'introduire dans les protocoles de recherche en biotechnologie (Hoffart *et al.*, 2017a; Lee *et al.*, 2016). Ces publications ont servi d'amorce à des efforts de recherche croissants qui, à ce jour, s'efforcent d'utiliser *V. natriegens* comme nouveau modèle pour la biologie moléculaire, la synthèse de protéines et comme souche de base pour la production de petites molécules. Cette bactérie Gram-négative anaérobie facultative est non pathogène et appartient au niveau de biosécurité 1 (Hoff *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2016). *V. natriegens* est en forme de bâtonnet avec un unique flagelle polaire. En fournissant suffisamment d'ions sodium, *V. natriegens* se développe rapidement sur des milieux complexes standards tels que le bouillon de lysogénie (LB) et le milieu d'infusion cerveau-cœur (BHI) (Eagon, 1962; Hoffart *et al.*, 2017; Weinstock *et al.*, 2016). Facile à manipuler en laboratoire et dans des conditions de culture optimales (croissance aérobie dans un milieu nutritif broth (NB) contenant 15 g/l de sels marins ou de NaCl, 37°C, pH 7,5), elle présente des temps de doublement minimum de 9,4 - 9,8 min ($\mu = 4,24 - 4,42 \text{ h}^{-1}$) qui n'ont été rapportés pour aucune autre bactérie non pathogène à ce jour (Eagon, 1962; Hoffart *et al.*, 2017). En conditions anoxiques, les cellules qui ne se divisent pas restent tout de même métaboliquement actives. *V. natriegens* présente une flexibilité nutritionnelle remarquable en ce qui concerne la source de carbone et s'est avérée être le membre le plus polyvalent de son genre (Hoff *et al.*, 2020). Le taux de croissance élevé de *V. natriegens*, démontré par les premières études d'ingénierie métabolique, justifie son utilisation pour le développement de biotechnologies industrielles pour ces travaux de recherche.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* : un modèle d'intérêt médical

Pseudomonas aeruginosa a été isolée pour la première fois par Gessard en 1882, tandis que le genre *Pseudomonas* a été décrit pour la première fois par Migula en 1894, *aeruginosa* étant l'espèce type du genre (Palleroni, 2010). Les membres de la famille des *Pseudomonaceae* sont omniprésents dans la nature (sols, plantes et environnements aquatiques) (Gurney *et al.*, 2020; Klockgether & Tümmler, 2017). *P. aeruginosa* est un micro-organisme très adaptable qui ne nécessite aucune condition de culture particulière. Ce pathogène se développe sur la plupart des milieux non sélectifs (Mueller-Hinton, Nutrient agar, Luria-Bertani, blood agar, etc.). Bien que sa température optimale de croissance soit 37°C, *P. aeruginosa* peut également survivre dans une large gamme de températures allant de 4 à 40°C (Gajdacs *et al.*, 2019). Parmi les caractéristiques phénotypiques de *P. aeruginosa*, l'odeur caractéristique (décrite comme fleurie, proche de l'acacia), la β -hémolyse (sur gélose au sang) et la couleur des colonies (dans des milieux de culture appropriés) permettent son identification rapide (Clark *et al.*, 2015).

P. aeruginosa et d'autres espèces du même genre sont connues pour produire divers pigments, dont la pyoverdine, la pyocyanine, la pyorubine et la pyomélanine (Allydice-Francis & Brown, 2012; Behzadi & Behzadi, 2008). L'un des facteurs les plus importants de la virulence dans la pathogenèse des infections à *P. aeruginosa* est la production abondante de biofilm. Particulièrement robuste contre les conditions environnementales difficiles et contre le système immunitaire de l'hôte (Jamal *et al.*, 2018a; Maurice *et al.*, 2018), les biofilms de cette bactérie ont des compositions hétérogènes, constituées d'agrégats de communautés bactériennes sessiles (biofilms mono ou multi-espèces), d'exopolysaccharides, d'ADN, de glucides, de protéines, de tensioactifs, de lipides, de divers ions et d'eau (Behzadi *et al.*, 2020; Lebeaux *et al.*, 2014). Les biofilms particulièrement tenaces de *P. aeruginosa* lui permettent de persister dans de nombreux environnements externes (tuyaux et réservoirs d'eau, éviers, carrelage, équipements médicaux, humidificateurs, équipements et cathéters de dialyse, dispositifs médicaux implantés, préparations médicales, liquide pour lentilles de contact, solutions antiseptiques et crèmes) et *in vivo* (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019; Jamal *et al.*, 2018; Lebeaux *et al.*, 2014). Cette bactérie appartient au niveau de biosécurité 2 en raison de sa ténacité face aux solutions antiseptiques et de sa pathogénicité élevée responsable de nombreuses infections telles que les infections de la peau et des tissus mous (Behzadi *et al.*, 2021), les infections de l'oreille moyenne (Pye, 2018) ou encore les pneumonies (Martínez-Alemán *et al.*, 2020). La production de biofilm chez cette bactérie est conséquente et systématique dans des conditions de culture classiques ce qui en fait un excellent modèle d'étude pour ce travail de thèse.

1.3. Cultures bactériennes

Les deux bactéries modèles Gram-négatives, décrites dans la section précédente, ont été utilisées : *P. aeruginosa* PAO1 et *V. natriegens* ATCC 14048. Elles ont été inoculées, à partir d'un stock congelé sur cryobilles à -80°C, dans un tube en téflon contenant 50 ml de Tryptic Soy Broth (TSB – *P. aeruginosa*) ou de Nutrient Broth (NB – *V. natriegens*). La salinité du milieu NB a été ajustée à 1,5 % par ajout de chlorure de sodium. Les cultures ont ensuite été incubées sous agitation (50 rpm) pendant une nuit à 37°C pour *P. aeruginosa* et à 28°C pour *V. natriegens*. Après chaque lecture, 100 µl de culture ont été inoculés par dépôt à la micropipette sur des boîtes de gélose nutritive (Tryptic Soy Agar et Nutrient Agar) afin de quantifier les unités formatrices de colonies (UFC). Pour toutes les expériences, la suspension bactérienne initiale a été ajustée à 2×10^7 UFC/ml pour *P. aeruginosa* et à 2×10^5 UFC/ml pour *V. natriegens*. Le développement rapide de *V. natriegens* justifie la concentration de départ plus faible. Les cinétiques de croissance bactérienne ont été réalisées par mesure automatisée de la densité optique (DO₆₀₀) au spectrophotomètre. Le protocole décrit dans les travaux de Naves *et al.* (2008) a été suivi pour déterminer la formation spécifique de biofilm des deux souches bactériennes. Suivant cette procédure, les bactéries sont inoculées dans leur milieu nutritif respectif dans une plaque de 96 puits à fond plat en polystyrène traité (Greiner Bio-one®). Ces plaques ont ensuite été incubées pendant une nuit sans agitation à 37°C et 28°C et la DO₆₂₀ de chaque puits a été mesurée. Ensuite, le milieu de culture a été retiré et les puits ont été rincés avec de l'eau distillée afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les puits ont été exposés à l'air pendant 20 minutes puis 100 µl d'une solution de cristal violet (CV) à 1% (v/v) ont été ajoutés pendant cinq minutes afin de colorer les cellules adhérentes. Le colorant a été retiré et les puits ont été rincés quatre fois avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant. Les plaques ont séché à l'air libre pendant 1 heure. Le colorant absorbé par les cellules adhérentes a ensuite été solubilisé dans 200 µl d'éthanol absolu. La DO₅₄₀ des puits a été mesurée. Ce protocole a été répété autant de fois qu'il y a de points de mesure dans la cinétique de formation de biofilm. La quantité de biofilm formé a été déterminée en appliquant la formule $SBF = (AB - CW) / G$, où SBF est l'indice de formation spécifique de biofilm, AB est la DO₅₄₀ des bactéries adhérentes colorées, CW est la DO₅₄₀ des puits de contrôle colorés contenant uniquement un milieu abiotiques et G est la DO₆₂₀ des cellules en suspension de la culture utilisée (Naves *et al.*, 2008). Les essais ont été réalisés trois fois. Toutes les mesures de densité optique ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN Infinite™.

2. Elaboration d'un modèle simplifié pour la conception du capteur

2.1. Préparation d'échantillons représentatifs d'un biofilm

L'objet de cette section est de présenter les essais préliminaires et les méthodes scientifiques adoptées qui ont abouti à la fabrication du nouveau capteur radiofréquence et de comprendre son fonctionnement. Les biofilms se révélant être des structures biologiques complexes, le premier modèle d'étude théorique est simplifié dans cette section, limitant le biofilm à ses principaux composés : l'eau, les cellules bactériennes et différents sucres (matrice polysaccharidique). Les structures et propriétés chimiques de ces composés sont hétérogènes. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle les propriétés électriques de ces derniers ne sont pas identiques et affectent les mesures du capteur différemment a été établie. Pour y répondre, dans un premier temps, plusieurs solutions ont été préparées afin d'étudier leurs propriétés électriques séparément. Ces gammes de solutions visent à simuler les variations de concentration qui peuvent être rencontrées au sein des biofilm naturels, c'est-à-dire proches de la réalité. Cinq gammes ont été réalisées. Toutes les concentrations sont indiquées dans le tableau 4 :

- La première se compose de cellules microbiennes. Après 24h de croissance dans du milieu TSB (Tryptic Soya Broth) à 37°C, des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ont été centrifugées (4°C) à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été retiré, remplacé par de l'eau déionisée et le culot a été dissout dans un liquide de rinçage sous agitation douce. La solution obtenue a ensuite été soumise à un second cycle de centrifugation. Cette étape de lavage a été répétée 2 fois supplémentaires. La densité cellulaire de la suspension finale a ensuite été déterminée par densitométrie optique à 600 nm. Le volume d'eau a été ajusté afin d'obtenir une DO_{600} de 0,83 correspondant à une concentration cellulaire proche de 10^{10} UFC/ml. Les suspensions de la gamme ont été préparées à partir de cette suspension mère et contiennent 0, 10^7 , 10^8 , 10^9 et 10^{10} UFC/ml.
- Les quatre autres gammes contiennent chacune un sucre de la liste suivante : Glucose, Mannose, Rhamnose et Galactose. Les concentrations sont de 0, 100, 150, 200 et 250 g/l. Ces gammes ont été préparées en dissolvant les sucres (produits commerciaux, Sigma Aldrich©) dans de l'eau purifiée. Ces sucres ont été sélectionnés conformément à la littérature scientifique afin de représenter au mieux les monomères produits par les souches PAO1 et ATCC 14048.

Tableau 4 : Concentrations des gammes réalisées dans de l'eau purifiée

COMPOSANT	CONCENTRATION				
	C0	C1	C2	C3	C4
Gamme n°1 : Glucose (g/l)	0	100	150	200	250
Gamme n°2 : Mannose (g/l)	0	100	150	200	250
Gamme n°3 : Galactose (g/l)	0	100	150	200	250
Gamme n°4 : Rhamnose (g/l)	0	100	150	200	250
Gamme n°5 : Cellules bactérienne (UFC/ml)	0	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰

2.2. Etude fondamentale des propriétés diélectriques des biofilms

La propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu est affectée par les propriétés physiques de ce dernier, notamment par sa permittivité diélectrique et sa conductivité électrique. L'étude de ces deux propriétés est donc essentielle pour la conception d'un capteur radiofréquence afin qu'il soit sensible à ces paramètres. Les propriétés diélectriques fondamentales décrivant les interactions entre le champ électrique appliqué et le matériau sont exprimées par la permittivité complexe du matériau dépendante de la fréquence. La permittivité diélectrique complexe d'un milieu est donnée par l'équation : $\epsilon^* = \epsilon' - j(\epsilon'' + \frac{\sigma}{\omega\epsilon_0})$.

La partie réelle ϵ' (constante diélectrique) traduit l'aptitude du matériaux à se polariser. La partie imaginaire ϵ'' correspond aux phénomènes de pertes diélectriques responsables du déphasage entre le champ appliqué et la polarisation induite. σ désigne la conductivité électrique du milieu. Le milieu diélectrique étudié réagit au champ appliqué suite à différents mécanismes diélectriques. Plusieurs types de polarisation diélectrique existent et sont représentés dans la figure 24.

Dans le cas de l'utilisation des ondes radio (< 10⁹ Hz), le processus de polarisation interfaciale, également appelée polarisation Maxwell-Wagner (Josh & Clennell, 2015; Oh *et al.*, 2007), se produit lorsqu'un écart de conductivité et de polarisation est rencontré entre la sonde et le matériau adjacent. L'accumulation des charges se produit alors au niveau des interfaces. Des phénomènes différents tels que des polarisations ioniques ou électroniques peuvent être mesurés, mais cela requiert l'utilisation de fréquences différentes :

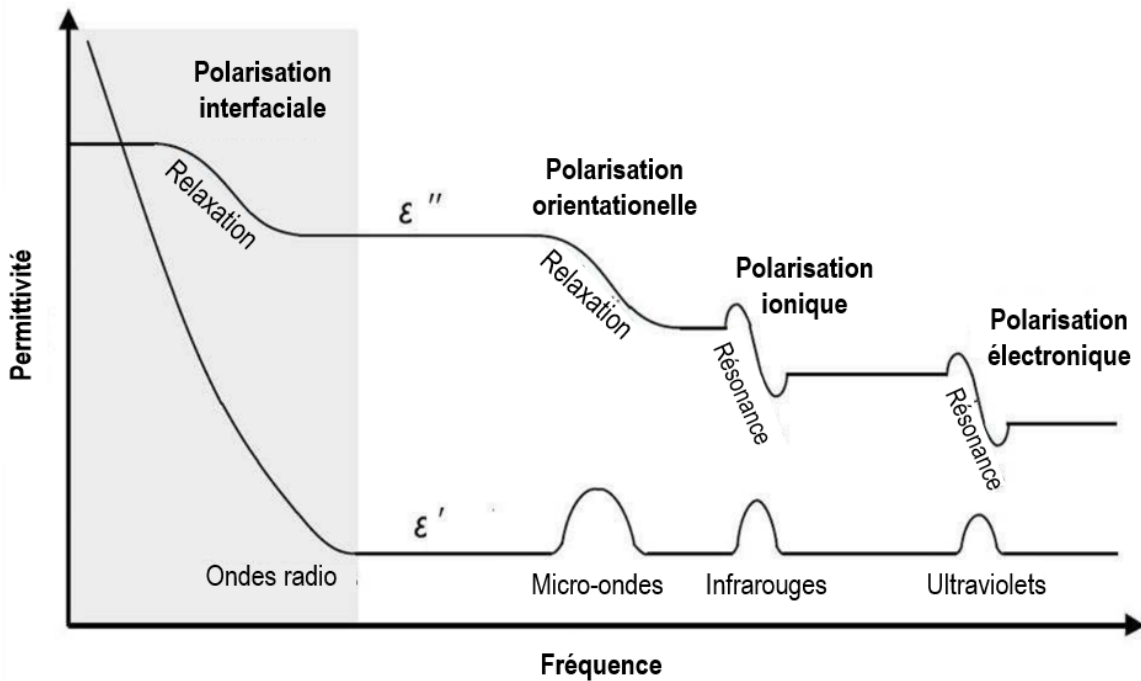


Figure 24 : Spectre général de permittivité diélectrique complexe d'une large gamme de fréquences.

- La polarisation dipolaire ou d'orientation décrit l'orientation de molécules polaires sous l'action du champ électrique. Ce processus est fortement dépendant de la température, de la pression et de la chimie de l'environnement. La relaxation associée à ce processus est observée dans le domaine de fréquence des micro-ondes (10^9 à 10^{11} Hz).
- La polarisation ionique correspond au déplacement mutuel des ions constituant une molécule. Ce mécanisme est observé aux fréquences infrarouges (10^{11} à 10^{12} Hz).
- La polarisation électronique ou optique est initiée par le déplacement des nuages électroniques vis-à-vis du noyau des atomes. Celle-ci opère au-delà du domaine des ultraviolets (10^{12} à 10^{14} Hz).

Les mesures de la permittivité complexe ont été réalisées à l'aide d'une sonde coaxiale ouverte de la marque Agilent sur un analyseur de réseau 8753ES (figure 25). Cette méthode est largement utilisée car elle est simple à mettre en œuvre. La sonde coaxiale est en réalité un guide d'ondes tronqué perpendiculairement à son axe. L'extrémité ouverte est placée dans l'échantillon à caractériser et l'admittance de la transition entre la sonde et le matériau est extraite des paramètres de réflexion mesurés. La détermination de la permittivité diélectrique à partir de cette mesure reste plus délicate. L'admittance $Y(f, \epsilon)$ est une fonction complexe qui dépend essentiellement de la fréquence f , la permittivité ϵ de la substance étudiée et des propriétés physiques de la sonde. Le système peut se modéliser électriquement par deux condensateurs en

parallèle. Il est conventionnel d'approximer la fonction $Y(f, \epsilon)$ par ce modèle où $Y(f, \epsilon) = j2\pi f(C_1 + C_2\epsilon)$, où C_1 et C_2 sont supposés représenter respectivement la capacité de la ligne et la capacité de la transition entre les deux environnements. Ce modèle est valable pour des fréquences inférieures à quelques GHz et les constantes C_1 et C_2 ont ici été déterminées en mesurant les admittances de l'eau purifiée et de l'éthanol dont les permittivités sont connues (respectivement 79,5 et 25,2 à 20°C). La sonde ainsi étalonnée a pu être utilisée pour mesurer les différentes solutions de permittivité (ϵ) inconnue.

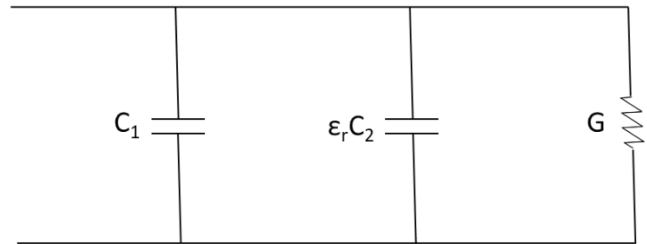
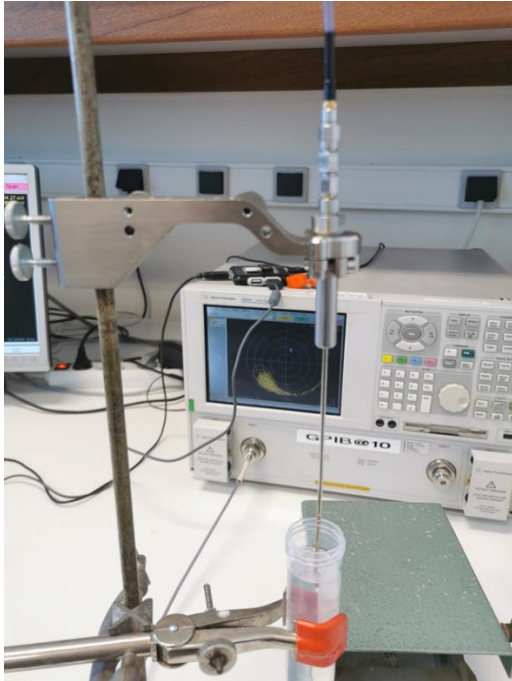


Figure 25 : Photographie de la sonde coaxiale Agilent plongée dans un des échantillons et schématisation du circuit équivalent de l'admittance de la sonde (C_1 et C_2 représentent les capacités parallèles et G est le terme dissipatif).

La permittivité absolue est une grandeur complexe composée d'une partie réelle et imaginaire. Elle s'exprime alors comme suit : $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$ où ϵ est la permittivité absolue, ϵ_r est la permittivité relative et ϵ_0 la permittivité du vide. Lorsque la permittivité complexe est représentée sous la forme d'un simple diagramme vectoriel, dans la figure 26, les composantes réelles et imaginaires sont déphasées de 90° . La tangente de perte ($\tan \delta$) est définie comme le rapport de la partie imaginaire sur la partie réelle.

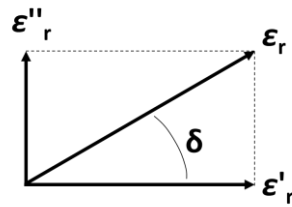


Figure 26 : Représentation de la permittivité complexe sous forme de diagramme vectoriel.

Il est bien connu que la permittivité diélectrique de l'eau évolue en fonction de la température. Mesuré par Andryieuski *et al.* (2015) dans la figure 27, ce phénomène est décrit par la formule de Debye :

$$\varepsilon(\omega, T_{eau}) = \varepsilon(T_{eau}) + \frac{\varepsilon_0(T_{eau}) - \varepsilon(T_{eau})}{1 - i\omega(T_{eau})}$$

Cette forte dépendance permet d'utiliser la température comme un autre moyen d'ajuster les propriétés électromagnétiques d'un matériau aqueux (Andryieuski *et al.*, 2015). Dans le cadre de cette thèse, les mesures ont été effectuées à 20°C, les valeurs de la partie réelle de l'eau avoisine donc en théorie la valeur 80 sur les fréquences inférieures à 1 GHz et sera proche de 0 sur la partie imaginaire.

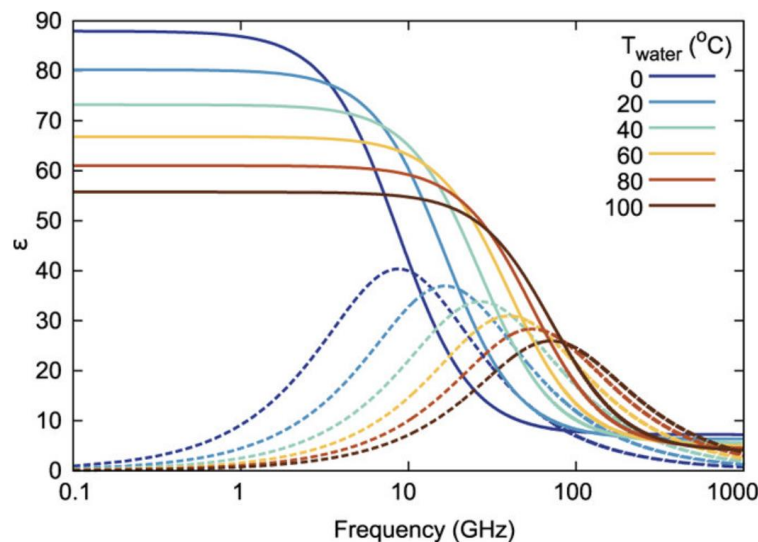


Figure 27 : Impact de la température de l'eau sur la permittivité relative en traits pleins et les pertes diélectriques en pointillés (Andryieuski *et al.*, 2015).

2.3. Conception du capteur radiofréquence : architecture et matériaux

Afin d'étudier de potentielles variations des propriétés diélectriques des biofilms bactériens, un nouveau capteur a été créé afin d'obtenir une analyse sans préparation, rapide et en temps réel. Le capteur de biofilm est composé d'une sonde positionnée à la verticale, sur un socle en plastique rigide, surmontée d'un réservoir en téflon qui peut contenir jusqu'à 120 millilitres de

culture bactérienne. La sonde est insérée au centre de la base. L'étanchéité est assurée par un joint en caoutchouc à la jointure du socle et du réservoir. Un couvercle de boîte de Petri adjoint de coton cardé et scellé au parafilm permet de maintenir la stérilité du réservoir sans stopper les échanges de gaz. Une étude du positionnement de la sonde a également été réalisée à l'aide d'un second capteur possédant une sonde supplémentaire à l'horizontale sur la paroi interne du réservoir. Une autre version du capteur intégralement en acier inoxydable a été fabriquée afin de faciliter la stérilisation de l'ensemble à l'aide d'un autoclave et diminuer les risques de contamination (figure 31). Il a été utilisé pour une application concrète, visant à valider l'activité antibiofilm de bactériophages afin de souligner le potentiel du capteur en tant que méthode complémentaire d'étude des biofilms. Cette application particulière sera présentée dans le chapitre IV de ce manuscrit. Seuls les capteurs en téflon sont utilisés dans les expériences de ce chapitre.

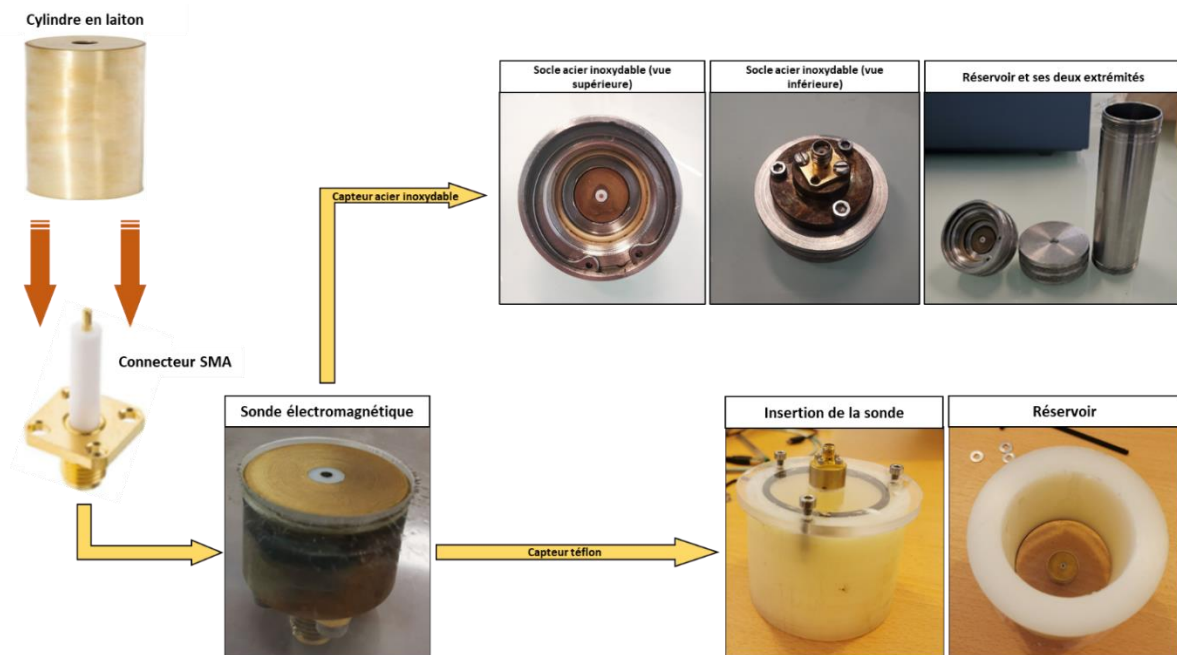


Figure 28 : Photographies représentant l'assemblage de la sonde ainsi que les deux types de capteur utilisés dans les essais de ce manuscrit.

La sonde électromagnétique consiste en une ligne diélectrique cerclée d'une couche isolante (PTFE) insérée dans un cylindre de laiton, comme indiqué dans la figure 31. Ainsi, lorsqu'une onde électromagnétique se propage dans la ligne centrale, appelée l'âme coaxiale, un champ électromagnétique se forme sur la partie tronquée. Il émane de l'âme coaxiale et rayonne jusqu'aux abords de la ceinture en laiton. Les diamètres de l'âme coaxiale, de l'isolant et du cylindre de laiton sont respectivement de 1,24, 4,0 et 18,2 mm. La hauteur de la sonde mesure 15

mm. La sonde a fait l'objet de nombreuses analyses de performances et de répétabilité. Les résultats donnés par la sonde sur la caractérisation de solvants aux propriétés électriques connues (eau, méthanol, éthanol) et inconnues (milieux de culture, eau de mer) ont été comparés à ceux obtenus à l'aide d'une sonde coaxiale commerciale (Agilent). De plus, des simulations informatiques ont également été réalisées afin de déterminer les paramètres ayant un fort impact sur les données collectées.

2.4. Préparation du capteur pour des mesures biologiques

Le protocole de caractérisation des biofilms est identique pour les deux bactéries étudiées. Les différentes pièces du capteur radiofréquence ont été dans un premier temps stérilisées par rinçages successifs de solutions antibiotiques (éthanol 70°, eau de javel) puis le réservoir et la sonde ont été exposés à un rayonnement ultraviolet pendant une heure tandis que les pièces métalliques ont été autoclavées à 121°C pendant 15 minutes. L'ensemble du capteur a été assemblé en conditions stériles. 10 ml de milieu de culture ont été versés dans le réservoir puis la culture bactérienne a été inoculée. Une boîte de Petri recouverte de coton cardé et maintenue par du parafilm a ensuite été déposée sur le réservoir. La sonde électromagnétique a été raccordée à un analyseur de réseau vectoriel par une ligne coaxiale. La gamme fréquentielle des mesures s'étend de 0,1 à 3 GHz. L'expérience a été pilotée par un programme LabView® effectuant des mesures toutes les 30 minutes pendant 48 heures pour *P. aeruginosa* et 24 heures pour *V. natriegens*.

2.5. Analyses statistiques

Toutes les courbes réalisées à partir du capteur radiofréquence représentent une moyenne de trois mesures indépendantes (qui n'ont pas été réalisées le même jour) chacune composée de trois mesures successives à chaque analyse. La signification des différences a été déterminée au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) et d'un test de Tukey afin d'effectuer les comparaisons multiples. Ces analyses ont été programmées et automatisées sur le logiciel R© (version 3.6.1). Le seuil de valeur $P < 0,05$ a été sélectionné afin de déterminer la signification des différences observées. Tous les tests réalisés indiquent qu'aucune différence statistique n'est présente entre les 9 répliques de chaque mesure.

III. ETUDES PRELIMINAIRES ET VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

1. Analyses de la permittivité diélectrique

Pour ces expériences, une sonde commerciale de la marque Agilent est utilisée. La caractérisation diélectrique entre 0,2 et 3,0 GHz, de la gamme n°5 (tableau 4) contenant des densités cellulaires croissantes est représentée dans la figure 29. Cette expérience a pour objectif d'identifier l'influence d'une hausse de la densité cellulaire sur la permittivité d'une solution. Le tracé des courbes de référence (concentration C0), correspondant à la caractérisation de l'eau purifiée, donne une valeur en accord avec les valeurs données par Andryieuski *et al.* (2015). Cependant, lorsque la densité cellulaire augmente, le profil des courbes change drastiquement. Un effet de polarisation interfaciale (voir figure 24) est observable sur la partie réelle (ϵ'), à partir de la concentration la plus faible (C1 = 10^7 UFC/ml). Cet effet semble s'amplifier à mesure que la densité bactérienne augmente. Les valeurs de ϵ' diminuent lorsque la fréquence augmente. Les dynamiques restent constantes entre les concentrations C1 et C4. La partie imaginaire ϵ'' affiche une variabilité importante sur les basses fréquences de la gamme d'étude. Une différence totale de 80 a été mesurée entre la référence et la concentration maximale à 200 MHz, contre seulement 5 à 3 GHz.

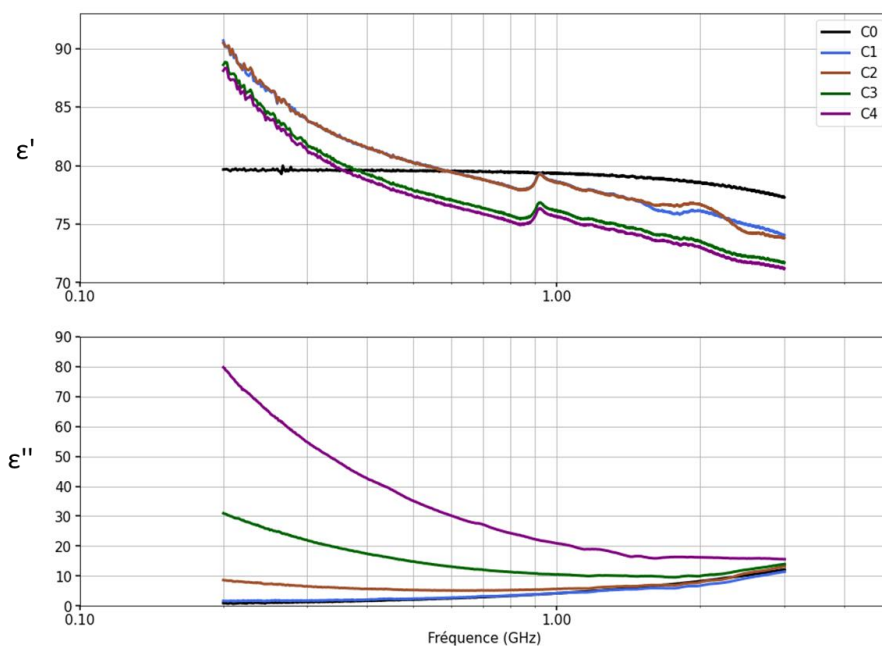


Figure 29 : Caractérisation diélectrique des solutions contenant des cellules bactériennes en suspension. De C0 à C4 : 0, 10^7 , 10^8 , 10^9 et 10^{10} UFC/ml.

La densité de cellules bactériennes en suspension dans l'eau semble donc influencer la permittivité globale du milieu. Les données indiquent un fort effet de polarisation de l'électrode. Ce phénomène, récemment mis en évidence par les travaux de Bobowski et Johnson (2020), peut être responsable de la hausse des valeurs de ϵ' aux basses fréquences. Cette polarisation indique la présence d'une quantité importante d'ions en solution. Il serait possible que les cellules bactériennes, qui se développent dans un milieu riche en molécules chargées, forment un gradient de charges important autour de la paroi cellulaire lorsqu'elles sont placées dans l'eau purifiée, théoriquement exempte d'ions. Chaque cellule tentant de rétablir un équilibre ionique, une libération naturelle de charges serait susceptible d'apparaître et d'entraîner la polarisation de la sonde en présence d'un champ électrique. Cette hypothèse pourrait également expliquer la hausse de ϵ'' aux basses fréquences de la gamme. Cette possible augmentation de charges peut se traduire par une nette hausse de la conductivité du milieu dont la conséquence est l'augmentation du facteur de perte.

En théorie, ce phénomène ne devrait pas être observé sur les caractérisations des propriétés électriques des sucres. Bien que ces derniers aient des structures moléculaires proches, ils ne portent aucune charge susceptible de provoquer une telle modification du milieu. Les figures 30 et 31 montrent les résultats de la caractérisation diélectrique des gammes des quatre sucres. La partie réelle (ϵ') est représentée dans la figure 30, la partie imaginaire (ϵ'') dans la figure 31. Une forte corrélation est observée dans leur propriétés diélectriques sur les deux composantes de la permittivité complexe. Il est intéressant de noter que ϵ' décroît sur l'entièreté de la gamme fréquentielle, phénomène amplifié à mesure que la concentration augmente. Le seuil de départ à 200 MHz chute également lorsque la teneur en sucre augmente. Toutes les valeurs sont proches entre chaque sucre, seul le galactose semble avoir un impact légèrement plus prononcé sur ϵ' , à sa concentration maximale. La dynamique globale des courbes se rapproche de celle de la référence (C0). Concernant la partie imaginaire, les profils de chaque sucre et de chaque concentration sont très proches et ne diffèrent pas vraiment de la référence (C0). Il est difficile de distinguer des variations nettes. La dynamique de la référence est conforme avec celle des travaux de Andryieuski (2015).

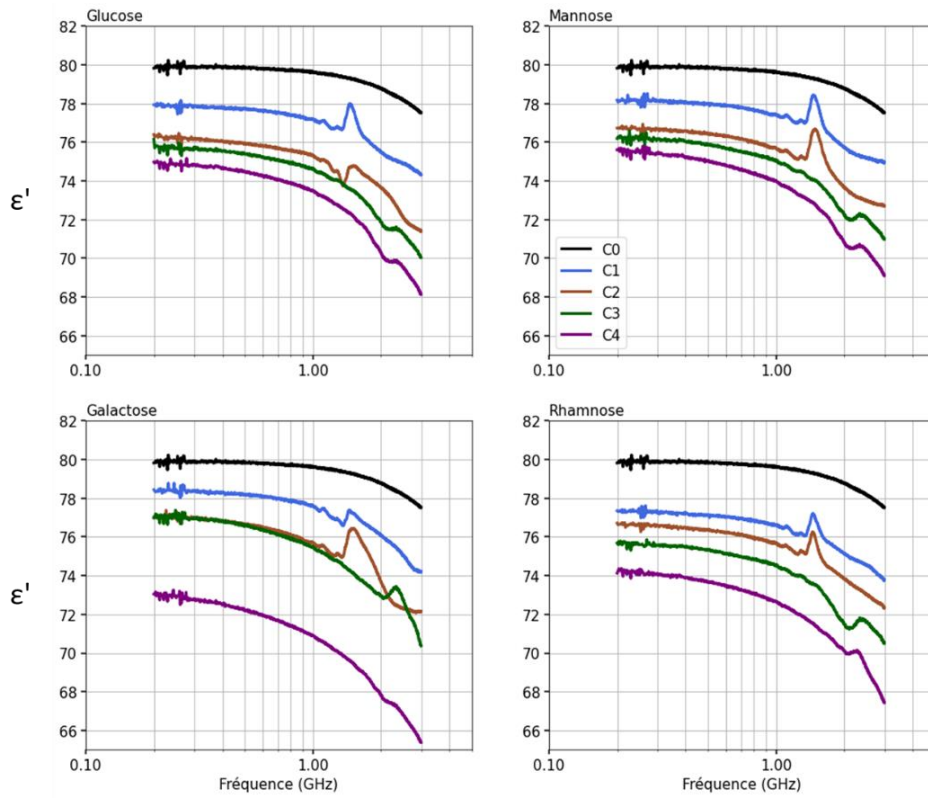


Figure 30 : Partie réelle de la permittivité complexe des sucres. De C0 à C4 : 0, 100, 150, 200 et 250 g/l.

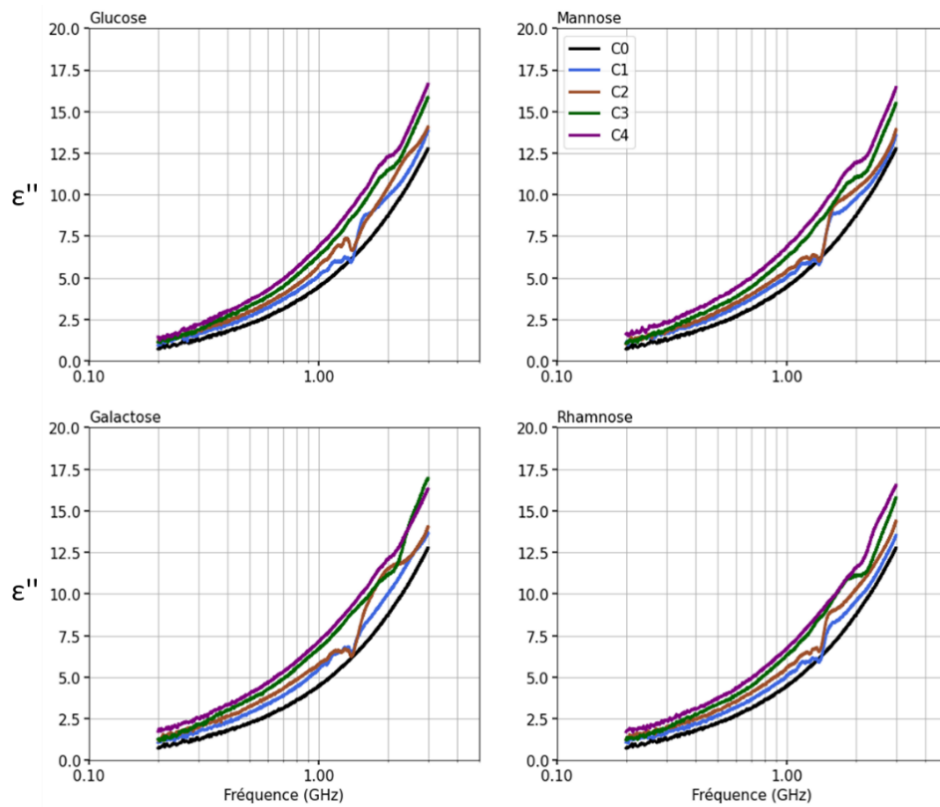


Figure 31 : Partie imaginaire de la permittivité complexe des sucres. De C0 à C4 : 0, 100, 150, 200 et 250 g/l.

Le tableau 5 affiche les différences de mesure, par rapport à la référence (notifié $\Delta\epsilon'$ et $\Delta\epsilon''$), sur quelques fréquences réparties sur la gamme d'étude. Les encadrés verts mettent en évidence l'impact non négligeable des concentrations en sucre sur les valeurs de ϵ' . Quant aux valeurs indiquées en rouge, elles soulignent l'effet important des cellules en suspension sur la partie imaginaire (ϵ''). Représentées sous cette forme, les données indiquent très clairement que la quantité de sucre entraîne une perte de permittivité relative proportionnelle à l'augmentation de la fréquence. En revanche, les variations de ϵ'' semblent essentiellement contraintes par la densité cellulaire, en particulier sur les basses fréquences de la gamme.

Turgul & Kale (2018) ont utilisé une démarche similaire afin d'étudier les propriétés diélectriques du sang. Étant une solution relativement complexe, le modèle de recherche a été réduit à un simple mélange d'eau et de glucose, principaux composants du sang, en proportions variables. Dans ces travaux, la permittivité complexe d'une gamme de glucose allant de 0 à 160 g/l a été étudiée à l'aide d'une sonde coaxiale conçue spécialement à cet effet. La gamme de fréquence s'étendait de 500 MHz à 20 GHz. Les résultats de ces mesures aboutissent aux mêmes constats que ceux présentés, et soulignent également un impact plus important de la quantité de glucose sur ϵ' au-delà de 10 GHz. La partie imaginaire montrait, comme dans la figure 31, de faibles variations par rapport à la référence. D'autres travaux se sont également focalisés sur l'étude de la permittivité complexe de cultures de microalgues (Bono Jr *et al.*, 2013), de bactéries (Wu *et al.*, 2016) ainsi que de champignons pathogènes (Hussein *et al.*, 2019). Leurs conclusions sont toutes unanimes sur l'augmentation de ϵ'' aux plus faibles fréquences des gammes étudiées. Pour conclure sur ces premières observations, ce modèle simplifié permet d'obtenir une meilleure approche pour comprendre l'évolution de la permittivité diélectrique des biofilms au cours de leur croissance. On peut émettre l'hypothèse que des variations importantes de conductivité et donc de pertes diélectriques soient occasionnées lors du développement bactérien, simulé par la gamme n°5 (tableau 4). Une chute de la permittivité relative (ϵ') à haute fréquence associée à la production d'EPS (modélisé par les 4 gammes de sucres) pourrait également être observée lors de l'étude d'un modèle réel. Il est donc possible d'envisager le suivi du développement d'un biofilm par une méthode radiofréquence.

Tableau 5 : Variabilité de la permittivité complexe des échantillons par rapport à la référence (eau purifiée à 20°C). Les valeurs colorées mettent en évidence les variations significatives.

		ϵ'					$\Delta\epsilon'$					ϵ''					$\Delta\epsilon''$				
		C0	C1	C2	C3	C4	C0	C1	C2	C3	C4	C0	C1	C2	C3	C4	C0	C1	C2	C3	C4
200 MHz	Glu	79,8	77,9	76,4	76,2	75,0	0,0	-1,9	-3,4	-3,7	-4,8	0,7	0,9	1,1	1,1	1,5	0,0	0,2	0,4	0,4	0,7
	Man	79,8	78,2	76,7	76,2	75,6	0,0	-1,6	-3,1	-3,6	-4,2	0,7	1,1	1,0	1,1	1,6	0,0	0,4	0,3	0,3	0,9
	Gal	79,8	78,4	77,0	77,0	73,0	0,0	-1,4	-2,8	-2,8	-6,8	0,7	1,1	1,2	1,3	1,7	0,0	0,3	0,5	0,5	1,0
	Rha	79,8	77,4	76,7	75,7	74,1	0,0	-2,5	-3,1	-4,1	-5,7	0,7	1,1	1,2	1,2	1,7	0,0	0,3	0,5	0,5	1,0
	<i>P. aeruginosa</i>	79,7	90,7	90,5	88,6	88,1	0,0	11,0	10,8	8,9	8,4	0,9	1,7	8,6	31,0	79,7	0,0	0,8	7,7	30,0	78,8
500 MHz	Glu	79,8	77,7	75,9	75,4	74,5	0,0	-2,1	-3,9	-4,4	-5,3	2,2	2,7	3,0	3,3	3,7	0,0	0,4	0,7	1,0	1,4
	Man	79,8	78,0	76,5	75,9	75,0	0,0	-1,8	-3,3	-4,0	-4,8	2,2	2,7	3,0	3,3	3,7	0,0	0,4	0,7	1,1	1,5
	Gal	79,8	78,2	76,7	76,6	72,2	0,0	-1,6	-3,2	-3,2	-7,6	2,2	2,8	3,2	3,7	3,9	0,0	0,6	1,0	1,4	1,7
	Rha	79,8	77,1	76,4	75,3	73,7	0,0	-2,7	-3,4	-4,5	-6,2	2,2	2,6	3,0	3,4	3,7	0,0	0,4	0,7	1,1	1,5
	<i>P. aeruginosa</i>	79,5	80,3	80,2	77,9	77,4	0,0	0,7	0,7	-1,7	-2,2	2,1	2,4	5,3	14,9	35,1	0,0	0,3	3,2	12,8	33,0
800 MHz	Glu	79,8	77,4	75,6	74,9	73,9	0,0	-2,4	-4,2	-4,8	-5,8	3,6	4,1	4,5	5,2	5,6	0,0	0,5	0,9	1,5	2,0
	Man	79,8	77,7	76,0	75,3	74,3	0,0	-2,1	-3,7	-4,4	-5,4	3,6	4,2	4,5	5,1	5,6	0,0	0,6	0,8	1,5	2,0
	Gal	79,8	77,9	76,1	75,9	71,4	0,0	-1,8	-3,6	-3,8	-8,4	3,6	4,4	4,8	5,6	6,0	0,0	0,7	1,2	1,9	2,3
	Rha	79,8	76,8	76,0	74,8	73,0	0,0	-2,9	-3,8	-5,0	-6,7	3,6	4,1	4,5	5,1	5,6	0,0	0,5	0,9	1,5	2,0
	<i>P. aeruginosa</i>	79,4	78,2	78,2	75,8	75,3	0,0	-2,1	-2,0	-4,5	-5,0	3,4	3,5	5,3	11,3	24,3	0,0	0,1	1,9	7,9	20,9
1,5 GHz	Glu	79,3	77,7	74,8	73,5	72,2	0,0	-1,5	-4,5	-5,8	-7,1	6,6	7,9	7,5	9,1	9,8	0,0	1,3	0,9	2,5	3,2
	Man	79,3	78,2	76,6	74,0	72,7	0,0	-1,0	-2,6	-5,2	-6,5	6,6	7,9	7,9	8,9	9,7	0,0	1,2	1,3	2,3	3,1
	Gal	79,3	77,2	76,4	74,1	69,5	0,0	-2,1	-2,8	-5,1	-9,8	6,6	7,5	7,8	9,3	9,8	0,0	0,9	1,2	2,7	3,2
	Rha	79,3	76,8	75,8	73,5	71,4	0,0	-2,4	-3,5	-5,8	-7,9	6,6	7,7	8,5	9,1	9,4	0,0	1,1	1,9	2,5	2,8
	<i>P. aeruginosa</i>	79,0	76,9	77,0	74,6	74,1	0,0	-2,1	-2,0	-4,5	-5,0	6,3	5,8	6,7	10,0	16,6	0,0	-0,6	0,4	3,6	10,2
3 GHz	Glu	77,5	74,3	71,4	70,0	68,1	0,0	-3,2	-6,1	-7,5	-9,4	12,8	13,9	14,1	15,8	16,6	0,0	1,1	1,3	3,1	3,9
	Man	77,5	75,0	72,7	71,0	69,1	0,0	-2,6	-4,8	-6,5	-8,4	12,8	13,6	13,9	15,5	16,5	0,0	0,8	1,2	2,7	3,7
	Gal	77,5	74,2	72,2	70,4	65,4	0,0	-3,3	-5,4	-7,1	-12,1	12,8	13,7	14,0	17,0	16,3	0,0	0,9	1,3	4,2	3,5
	Rha	77,5	73,8	72,3	70,5	67,4	0,0	-3,7	-5,2	-7,0	-10,1	12,8	13,5	14,4	15,8	16,5	0,0	0,8	1,6	3,0	3,8
	<i>P. aeruginosa</i>	77,3	74,1	73,8	71,7	71,2	0,0	-3,2	-3,5	-5,6	-6,1	12,2	11,4	13,2	14,0	15,6	0,0	-0,7	1,1	1,8	3,4

2. Validation de la sonde hyperfréquence

2.1. Obtention du coefficient de réflexion S_{11}

L'utilisation de la sonde requiert la génération d'un signal électromagnétique de fréquence variable. Pour ce faire, un analyseur de réseau vectoriel (VNA) MasterTM MS2037C de la marque Anritsu® a été utilisé. Les bornes de fréquence générées par cet appareil vont de 5 KHz à 6 GHz. D'après la théorie des lignes, lorsqu'une onde électromagnétique se propage dans une ligne d'impédance fixe et rencontre un milieu d'impédance différente, une partie de cette onde est transmise au milieu tandis que l'autre est réfléchi. Le VNA permet de déterminer le ratio onde transmise/onde réfléchi et mesure un coefficient de réflexion noté S_{11} exprimé en décibel (dB). Cette unité mathématique logarithmique exprime l'atténuation d'un signal dont les degrés d'atténuation par palier sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Atténuations théoriques de signal correspondantes aux valeurs de décibel

Valeur en décibel	Pourcentage d'atténuation
0 dB	0%
10 dB	90%
20 dB	99%
30 dB	99,9%
40 dB	99,99%

2.2. Détermination de la gamme fréquentielle des mesures

Dans le cadre de la validation du système de mesure, les performances du dispositif expérimental ont été comparées à un matériel de référence (sonde coaxiale Agilent commerciale, analyseur de réseau 8753ES). Habituellement, la calibration d'une sonde coaxiale s'effectue sur la partie tronquée, pour prendre en compte les éventuelles pertes de signal le long de la ligne de transmission et lorsque le signal traverse la sonde. La calibration du capteur fabriqué (type SOL – Short, Open, Load) a été réalisée en bout de ligne uniquement pour cause d'incompatibilité du matériel de calibration classique avec l'architecture de la sonde.

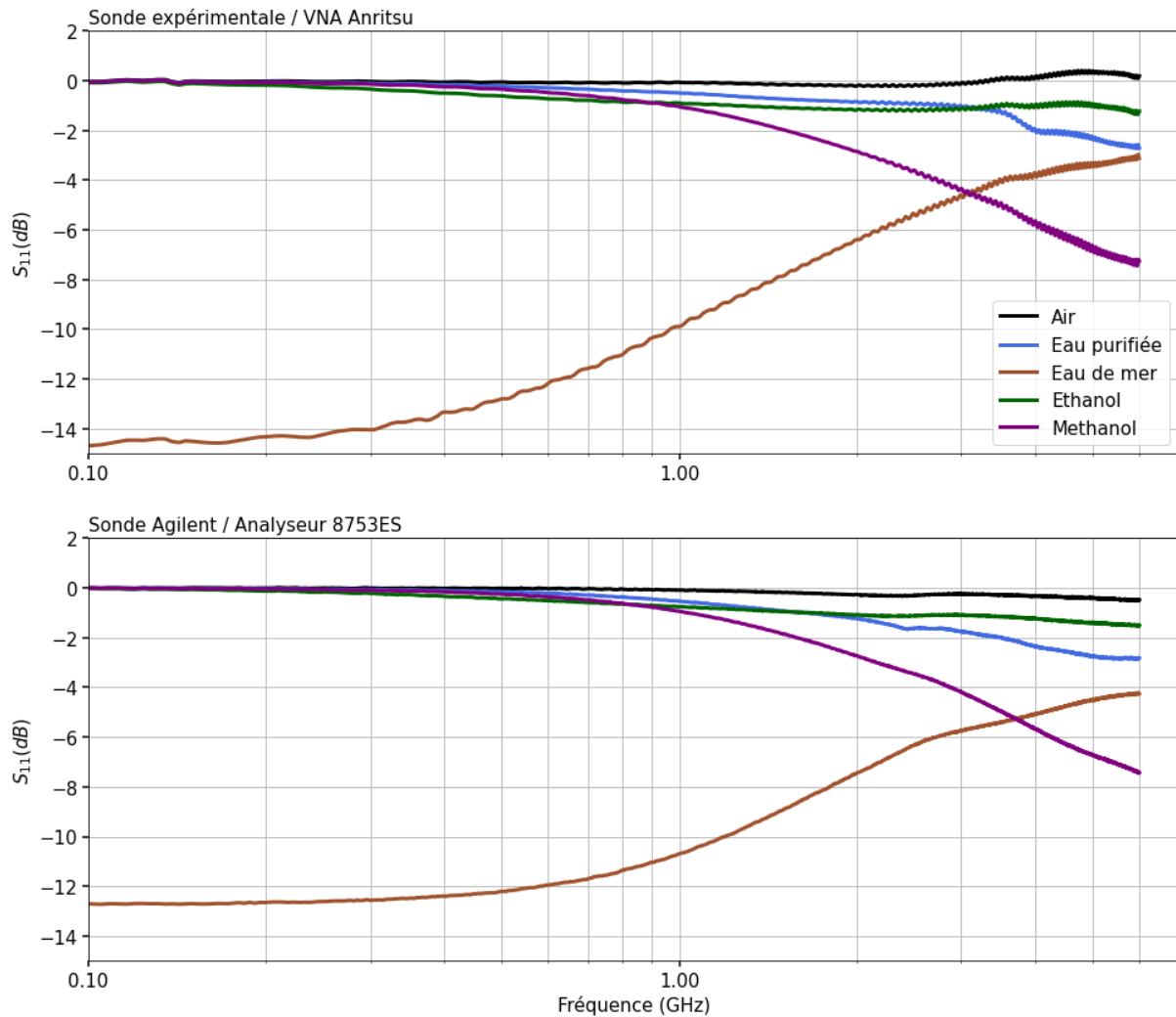


Figure 32 : Validation du dispositif expérimental : comparaison des mesures de différents liquides avec le matériel de référence.

La validation est réalisée en comparant directement les résultats de la caractérisation de liquides aux propriétés électriques connues (eau purifiée, eau saline, éthanol et méthanol) avec les deux appareils (figure 32). En raison des limitations de la sonde commerciale pour les basses fréquences, la plage de validation s'étend de 100 MHz à 6 GHz. La sonde expérimentale génère des résultats cohérents avec ceux du matériel de référence, mais est moins précise. Les données valident la gamme de mesure jusqu'à 3 GHz. Au-delà, des oscillations parasites apparaissent et les résultats sont trop divergents de ceux de référence. Les valeurs regroupées dans le tableau 7 représentent l'erreur de mesure par rapport au matériel de référence. Ces données indiquent effectivement qu'au-delà de la fréquence de 3 GHz l'erreur de mesure augmente fortement, notamment pour les solutions aqueuses. Les expériences exposées dans ce manuscrit seront donc limitées à une borne supérieure de 3 GHz.

Tableau 7 : Erreur de mesure du VNA MS2037C/Capteur par rapport à l'analyseur 8753ES.

Fréquence (GHz)	Pourcentage d'erreur par rapport au matériel de référence				
	Air	Eau purifiée	Eau de mer	Ethanol	Méthanol
0,1	0,7	0,9	13,2	2,1	5,1
0,2	0,9	1,2	9,3	4,8	6,6
0,3	3,1	0,1	5,7	5,0	5,2
0,5	2,7	2,0	0,5	3,9	3,6
0,8	3,2	5,2	0,3	3,4	2,8
1,0	0,6	6,7	0,7	2,0	1,1
1,5	4,7	7,0	1,2	1,4	5,7
2,0	10,5	9,5	7,9	8,3	3,9
3,0	59,4	42,1	19,3	2,3	3,5
4,0	143,1	30,7	26,3	21,2	0,6
5,0	200,8	21,2	24,0	34,1	1,4
6,0	139,6	34,0	26,6	18,9	2,4

Malgré les limites présentées précédemment, cette sonde possède les avantages d'être peu coûteuse. Les connecteurs SMA sont disponibles pour moins de 15€. Le coût global reste bien en deçà de ceux des autres capteurs comme par exemple les capteurs de biofilm ALVIM ayant un coût pouvant atteindre plusieurs milliers d'euros. Les dimensions de la sonde en font également un outil facilement transportable et ergonomique.

IV. MODELISATION NUMERIQUE

Inspiré du concept des sondes coaxiales classiques, l'ensemble du système de mesures a été modélisé et simulé informatiquement. Afin d'étudier la réflexion d'onde du capteur, les simulations électromagnétiques ont été effectuées à l'aide du logiciel High Frequency Structural Simulator d'ANSYS (HFSS). Il utilise des éléments de maillage tétraédriques pour déterminer une solution à un problème électromagnétique donné. Le balayage de fréquence est réalisé entre 0,1 et 3,0 GHz, conformément aux conclusions de la validation expérimentale du système. Le modèle sélectionné pour les simulations comprend l'ensemble du capteur (sonde et réservoir) et un liquide (figure 33) dont les propriétés électriques seront modifiées afin d'observer leurs impacts sur le paramètre de réflexion S_{11} .

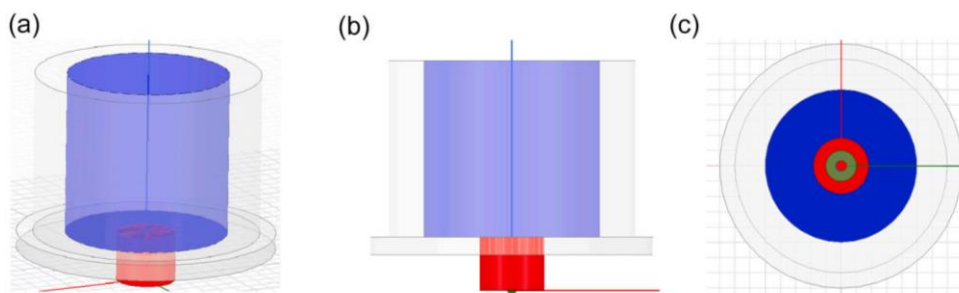


Figure 33 : Modélisation informatique du capteur. La pièce rouge représente la sonde, la partie blanche correspond au réservoir et la zone bleue est un liquide aux propriétés diélectriques variables. a) vue globale ; b) vue de face ; c) vue supérieure.

1. Cartographie des champs électriques émis

En fonctionnement, le capteur génère un champ électromagnétique à partir de la surface tronquée entre l'âme du coaxial et la ceinture de laiton. Le champ rayonne sur une distance dépendante de la nature du milieu dans lequel se trouve la sonde. La figure 34 illustre la cartographie d'un champ généré sur le logiciel HFSS lorsqu'une onde de fréquence égale à 0,5 GHz se propage dans un liquide de conductivité variable. La permittivité est fixée à 81 car, dans ces simulations, la sonde se situe dans de l'eau. La conductivité est quant à elle modifiée et vaut 0, 3 et 5 S/m afin d'étudier l'impact de ce paramètre sur la géométrie du champ électromagnétique généré. Ce paramètre a été sélectionné en raison de sa forte variation lors des analyses à l'aide de la sonde coaxiale commerciale, lorsque la densité cellulaire était en hausse. La géométrie du champ électrique semble quasiment identique dans les trois cas. Cependant, l'intensité du champ est condensée aux abords de la sonde et s'affaiblit rapidement avec la distance. Pour une conductivité nulle, les simulations indiquent un rayon de champ égal à 3,5 millimètres, contre 2,0 millimètres lorsque la conductivité vaut 5 S/m.

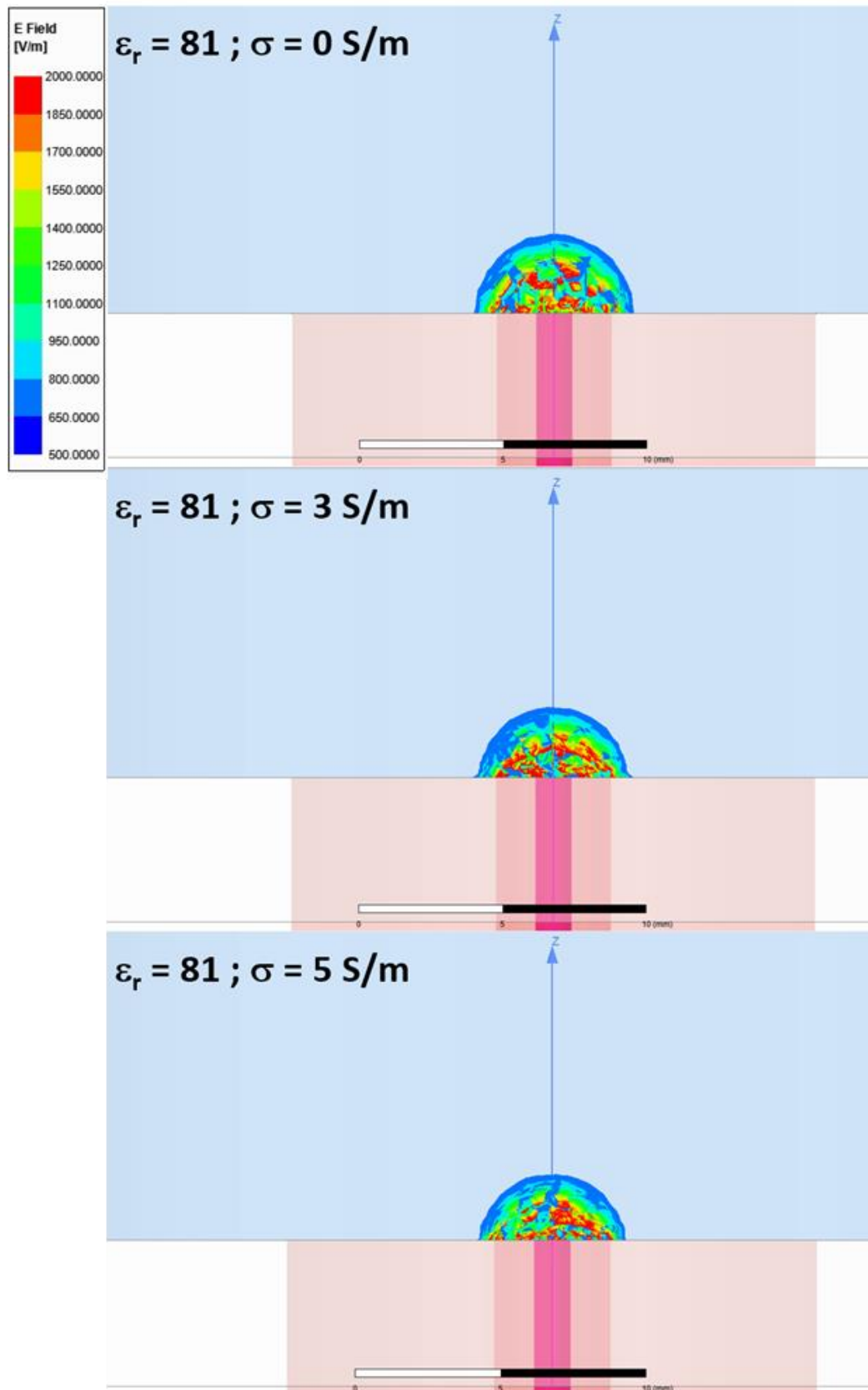


Figure 34 : Modélisation HFSS de l'impact de la conductivité de la solution sur le champ électrique généré en bout de sonde.

2. Distance d'immersion de la sonde

La cartographie des champs électriques générés par la sonde indique que les ondes électriques se propagent de quelques millimètres dans le liquide. Par conséquent, la profondeur d'immersion de la sonde est un paramètre légitime à étudier. La figure 35 représente l'impact de la hauteur de liquide sur les variations du coefficient S_{11} sur la gamme de fréquences 0,1 – 3,0 GHz.

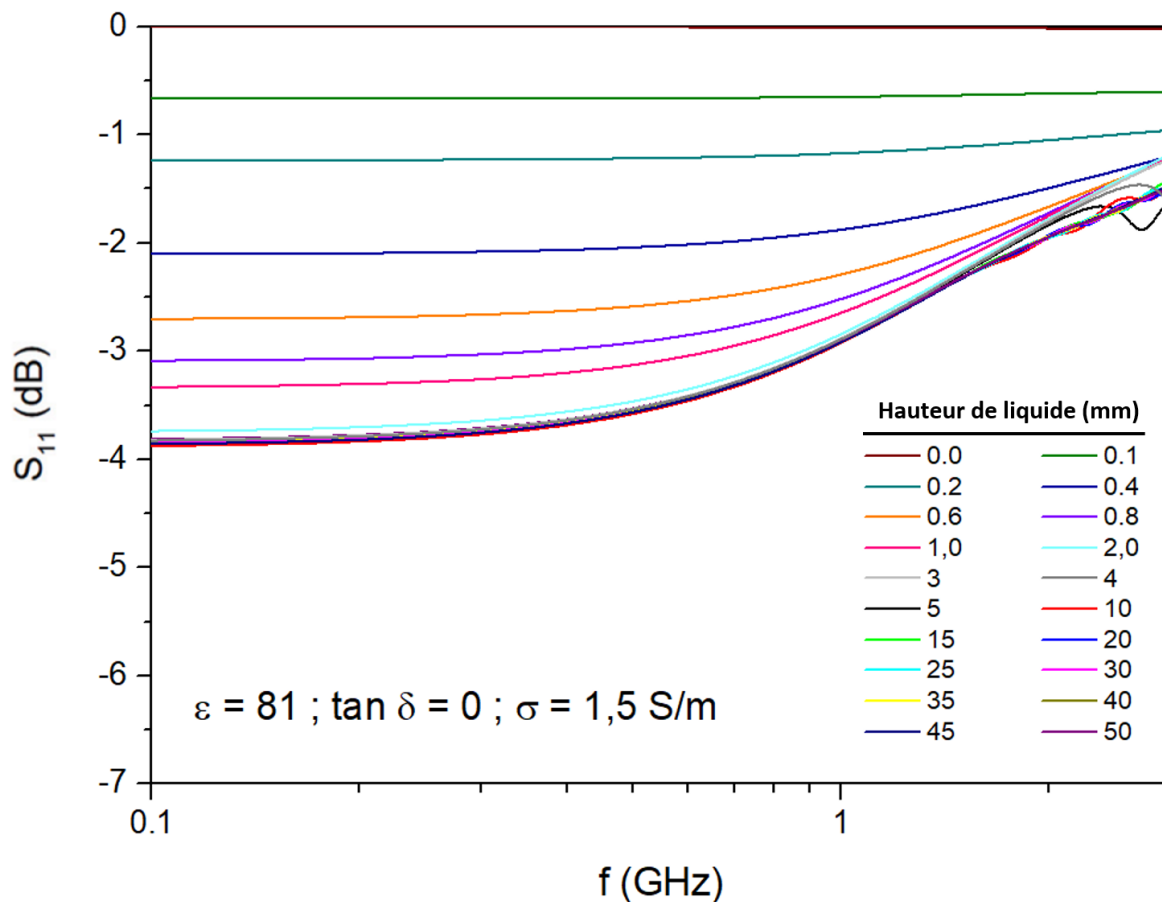


Figure 35 : Modélisation HFSS de l'impact de la hauteur de liquide sur le paramètre de réflexion S_{11} .

Sur cette simulation, la profondeur d'immersion de la sonde a été sélectionnée allant de 0 (mesure dans l'air) à 50 mm. La permittivité et la conductivité du milieu sont constantes et respectivement égales à 81 (permittivité de l'eau) et 1,5 S/m (conductivité d'un milieu de culture utilisé). Lorsque la profondeur augmente de quelques centaines de microns, le coefficient de réflexion chute rapidement. Dès lors que la profondeur d'immersion est différente de 0, les courbes sont de plus en plus convexes. La hauteur de liquide semble impacter plus fortement les mesures inférieures à 1,0 GHz. Au-delà de 2 mm d'immersion, l'influence devient négligeable sur le coefficient S_{11} . Ce seuil correspond probablement à l'instant où le champ électrique rayonne uniquement dans le liquide. En dessous de 2 mm de hauteur, la sonde mesure les propriétés diélectriques d'un ensemble air/liquide.

De plus, la variation maximale en décibel dans la gamme 0,1 – 0,5 GHz est égale à 3,8 dB. Néanmoins, les 600 premiers microns d'immersion provoquent une chute égale à 75% de cette valeur. Difficile à observer dans la figure 34, l'intensité du champ électrique peut expliquer ce phénomène. Le champ est hétérogène et très intense lors des premiers microns parcourus mais se dissipe rapidement avec la distance. La sensibilité de la sonde devrait donc être accrue sur les premières couches du liquide parcourues.

Le seuil de profondeur de 2 mm où les variations cessent pourrait correspondre à la distance de rayonnement maximale du champ dans les conditions définies. L'hétérogénéité du champ est en réalité un avantage pour la détection des biofilms car, d'après ces simulations HFSS, c'est sur ces premières couches que la sensibilité de la sonde semble meilleure. Un biofilm de quelques dizaines de microns qui colonise la sonde serait donc en théorie placé dans la zone la plus sensible du capteur.

3. Effet de la permittivité électrique et de la conductivité

Selon les conclusions de l'étude préliminaire sur les propriétés électriques des principaux composants des biofilms, la permittivité relative, liée à la teneur en polysaccharides, donne des variations maximales de permittivité d'une quinzaine d'unités (de 80 à 66 pour une concentration de galactose allant de 0 (200 MHz) à 250 g/l (3,0 GHz) - voir figure 29). Ces valeurs seront sélectionnées pour les simulations HFSS. La conductivité a quant à elle été fixée à 1,5 S/m. Cette valeur correspond à celle du milieu de culture TSB utilisé dans les expériences de ce manuscrit, à 37°C. La figure 36 représente l'influence des variations de permittivité (36A) et de conductivité (36B) sur le coefficient S_{11} en fonction de la fréquence, simulé par le logiciel HFSS.

La figure 36A souligne une faible influence de la permittivité relative sur le paramètre de réflexion S_{11} . Les valeurs convergent vers le même point sur les basses fréquences et semblent se différencier uniquement au-delà de 700 MHz. Ces résultats soutiennent les conclusions apportées dans la première section de ce chapitre indiquant une meilleure sensibilité de la permittivité vers les fréquences élevées. Les limitations de la gamme fréquentielle ne permettent pas d'obtenir une différenciation nette des courbes, mais il aurait probablement été possible de visualiser de meilleures variations au-delà de 3 GHz.

D'autre part, les simulations démontrent dans la figure 36B que la conductivité est un facteur impactant profondément le paramètre de réflexion S_{11} mais l'impact est cette fois plus conséquent sur les basses fréquences de la gamme. En balayant la conductivité de 0 à 5 S/m, avec un pas de 0,5 S/m, les simulations montrent une chute du paramètre S_{11} sur l'entièreté de la

gamme fréquentielle avec une différence beaucoup plus marquée sur les basses fréquences, atteignant quasiment -16 dB.

Les travaux de Bobowski et Johnson (2020) valident ces observations. En mesurant la permittivité aux basses fréquences d'échantillons de conductivité variable, leurs analyses confirment la modification des résultats par des effets de polarisation. D'après leurs conclusions, une électrode métallique acquiert une charge de surface due à la dissociation des molécules de surface de l'électrode ou à l'absorption des ions de la solution lorsqu'elle est immergée dans une solution électrolytique. En réponse à cette charge de surface, la concentration d'ions de charges opposées provenant de l'électrolyte augmente dans la région de l'électrode. Ces contre-ions sont liés et forment une double couche électrique à l'interface électrode-électrolyte. En pratique, en raison des réactions électrochimiques à l'électrode, il est souvent nécessaire d'inclure un terme de conductance, de sorte qu'un modèle précis nécessite une impédance de polarisation d'électrode complexe complète.

Dans le cas des mesures avec la sonde coaxiale à extrémité ouverte commerciale, les mesures de permittivité à basse fréquence sont délicates car l'impédance de polarisation de l'électrode dépend de la fréquence de mesure, de la conductivité de l'échantillon, de la géométrie de l'électrode et de la densité de courant. Concernant le capteur, les simulations HFSS indiquent une sensibilité importante de la sonde aux changements de conductivité du milieu. Cependant, malgré l'absorption des ions sur le métal, à l'inverse des sondes coaxiales, aucun modèle électrochimique équivalent n'est requis car il n'est pas nécessaire de remonter aux valeurs de permittivité complexe. L'utilisation du paramètre S_{11} brut permet l'affranchissement de correction de l'effet de polarisation de la sonde.

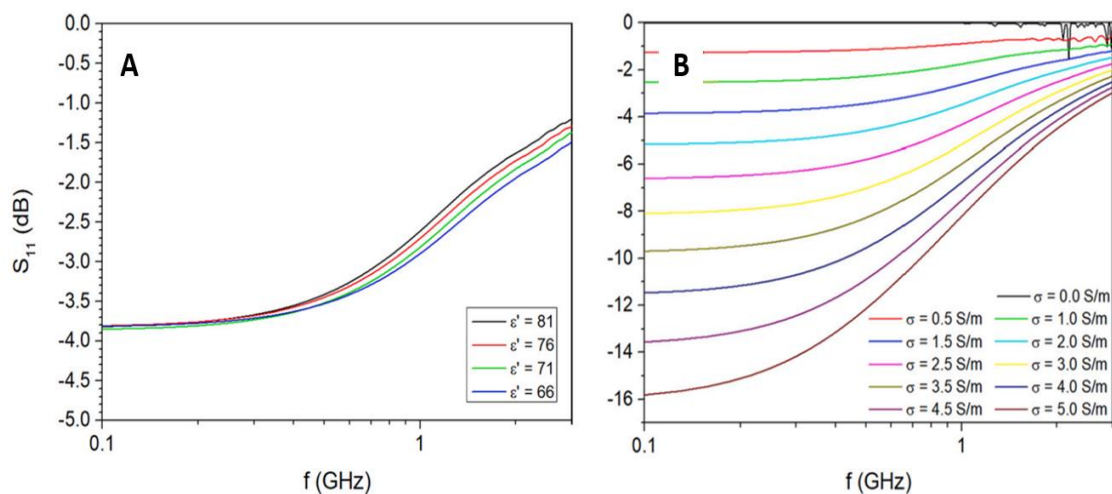


Figure 36 : Simulations HFSS de l'impact des variations de permittivité électrique et de conductivité sur le paramètre de réflexion S_{11} .

4. Simulation de la croissance d'un biofilm

Afin de mieux correspondre aux conditions de mesure réelles, un second système a été modélisé, prenant en compte une fine couche de liquide aux caractéristiques électriques différentes au-dessus de la sonde. La figure 37 schématise le nouveau système, avec en vert cette couche supplémentaire ayant pour objectif de représenter un biofilm bactérien.

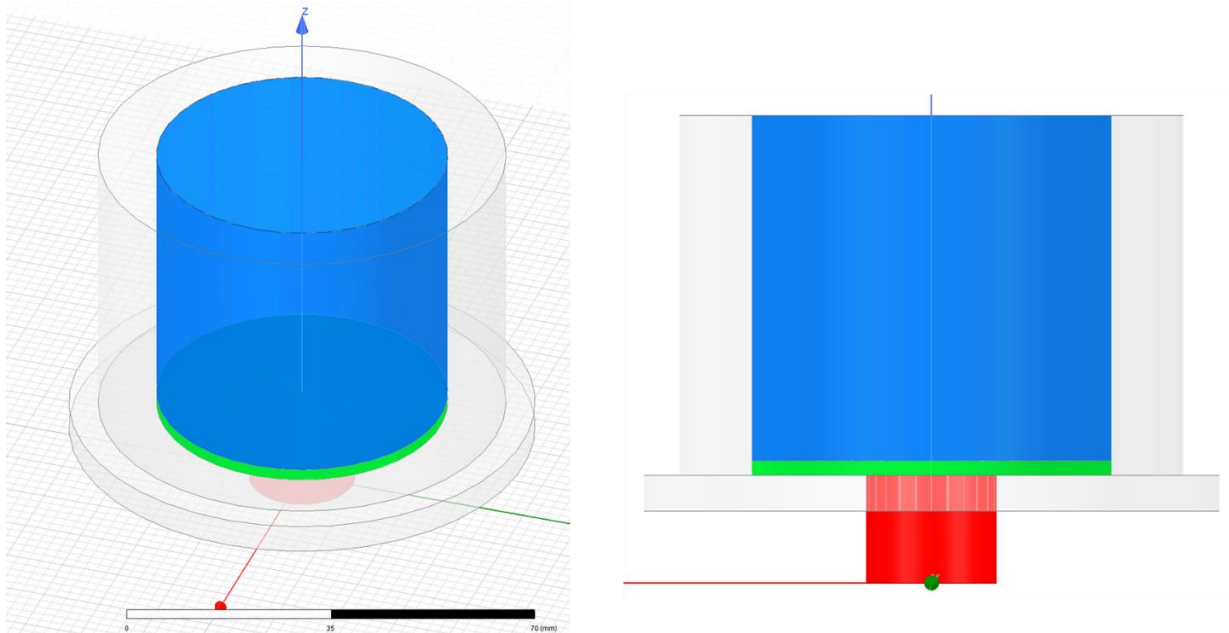


Figure 37 : Modélisation informatique du capteur prenant en compte la formation d'un biofilm (partie verte).

L'augmentation progressive de l'épaisseur de cette couche permet de simuler, avec exagération, la formation d'un biofilm sur la sonde. Dans un premier temps, la conductivité du milieu de culture (liquide bleu dans la figure 37) a été définie à 1,5 S/m (valeur du milieu de culture TSB à 37°C, pH = 7,2). Afin de représenter une couche bactérienne dense en formation à la surface du capteur, la conductivité du biofilm est fixée à 3,0 S/m. La permittivité des deux liquides est placée à 81 car, comme observé dans la figure 36, ce paramètre a peu d'impact sur le coefficient de réflexion mesuré par le capteur. De plus, un biofilm est composé à 95% d'eau (Kassinger & Van Hoek, 2020), il est donc probable que la permittivité d'un tel matériau soit proche de celle de l'eau. La hauteur de liquide totale dans ce système est de 10 mm.

L'influence de l'épaisseur du biofilm sur le coefficient de réflexion S_{11} et la variation relative du coefficient normalisé ΔS_{11} sur plusieurs fréquences sont représentées dans la figure 38. Bien qu'éloignée de la réalité, l'épaisseur de la solution « biofilm » a été augmentée jusqu'à atteindre une valeur H_{biofilm} égale à 10 mm d'épaisseur et remplacer l'entièreté de la solution bleue. Cette particularité permet de générer des informations complémentaires sur la sensibilité du capteur.

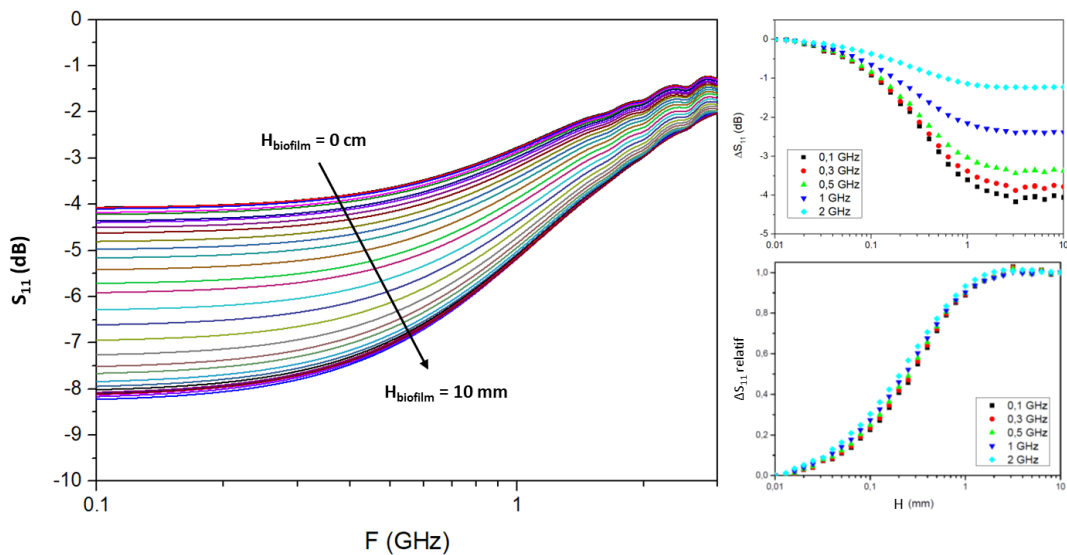


Figure 38 : Simulation HFSS de l'épaissement d'un biofilm. $\sigma_{\text{solution}} = 1,5 \text{ S/m}$; $\sigma_{\text{biofilm}} = 3,0 \text{ S/m}$; $\epsilon = 81$.

Le coefficient S_{11} s'abaisse de -4 à -8,3 dB sur les fréquences les plus sensibles, inférieures à 0,5 GHz. Au-delà, les courbes convergent vers une même valeur lorsque les fréquences dépassent 1,0 GHz. Ces données brutes sont difficiles à interpréter. Cependant, le tracé de la variation du coefficient S_{11} normalisé (ΔS_{11}) ainsi que son évolution relative par rapport à la variation maximale obtenue à différentes fréquences donnent des informations importantes sur le fonctionnement du capteur :

- Les valeurs ΔS_{11} valident la meilleure sensibilité de la sonde sur les basses fréquences de la gamme.
- Le ΔS_{11} relatif indique que la tendance des variations observées lors de l'épaissement du biofilm, sur toutes les fréquences de la gamme, est identique et de même niveau. Cela confirme que, malgré une sensibilité amoindrie vers les hautes fréquences de la gamme, les variations restent proportionnelles au niveau de S_{11} atteint.
- L'épaisseur croissante du liquide « biofilm » représenté sur un axe logarithmique signale une détection du biofilm à partir des premières dizaines de microns. Le ΔS_{11} relatif atteint la valeur de 1 (100% de la variation atteinte) à partir d'une épaisseur de biofilm de 2 mm. Cette observation est en concordance avec les études de champ précédentes.

Enfin, une simulation supplémentaire a été réalisée en ajustant les valeurs de conductivité allant de 1,5 à 8,0 S/m, pour une valeur de ϵ' égale à 70. Les trois graphiques de la figure 39 représentent les variations du coefficient S_{11} en fonction de la conductivité pour des biofilms (non réels) ayant une épaisseur de 30, 50 ou 100 μm , plus représentatives de la réalité.

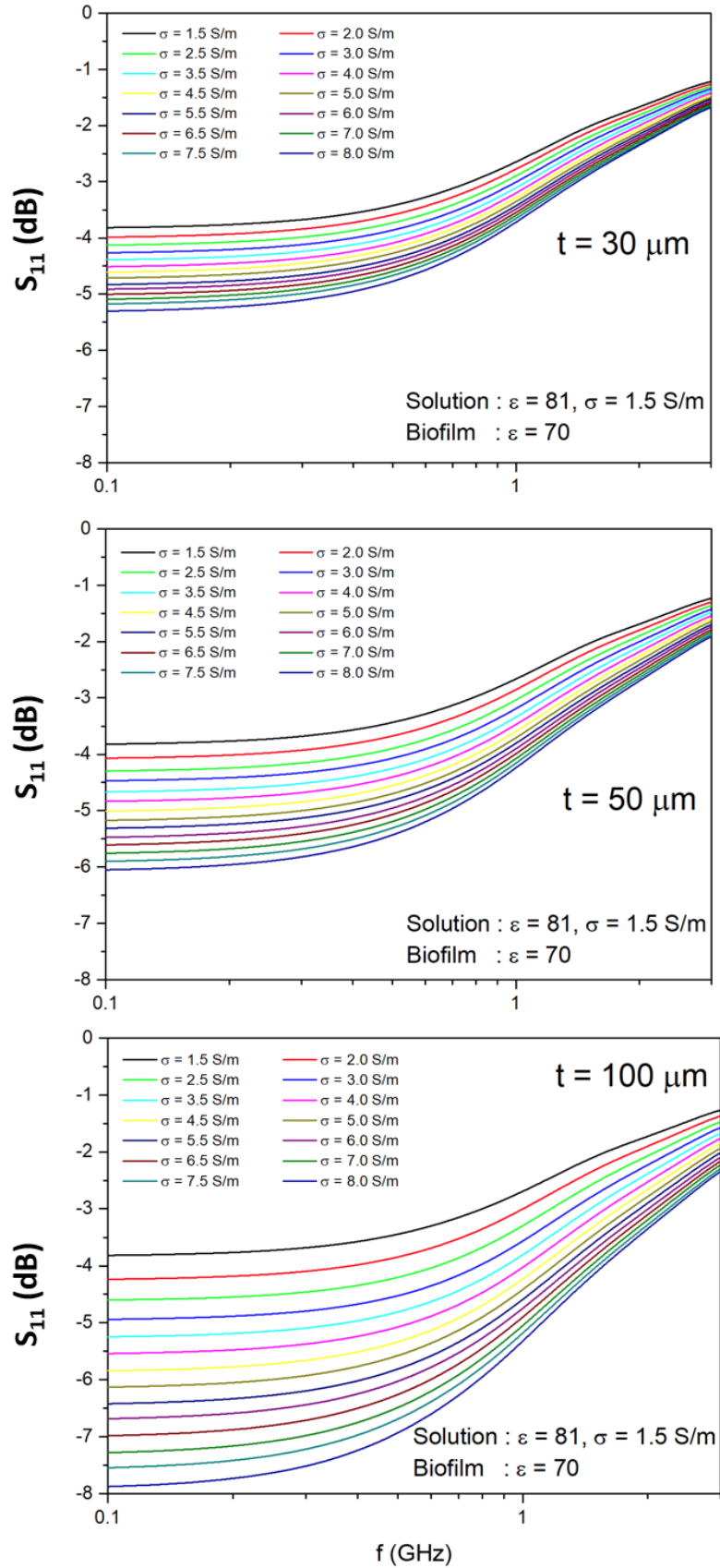


Figure 39 : Simulation HFSS de l'impact de la conductivité sur le coefficient de réflexion S_{11} pour une épaisseur de biofilm égale à 30, 50 et 100 μm .

Cette figure met en avant la forte sensibilité du capteur qui pourrait être obtenue expérimentalement. D'après ces simulations, un biofilm de 30 μm serait largement détectable si la conductivité au sein du film bactérien augmente. Ayant observé dans la section précédente que la densité bactérienne influençait significativement la conductivité du milieu (via les variations de ϵ''), il est en effet probable qu'un biofilm, regroupant une forte concentration bactérienne locale, engendre une hausse conséquente de la conductivité au niveau de la sonde. Les variabilités totales observées à basse fréquence pour des films de 30, 50 et 100 μm sont respectivement de -1,6, -2,2 et -4 dB. Les simulations indiquent une sensibilité moindre dans les zones convergentes. Cependant, dans des conditions réelles, la densité cellulaire en suspension devrait également augmenter. Il reste donc difficile de prévoir avec fiabilité quelles seront les variations attendues.

5. Bilan des simulations numériques

En conclusion, ces simulations donnent d'amples informations sur le fonctionnement théorique du capteur. D'une part, la géométrie du champ électrique généré devrait essentiellement dépendre de la fréquence employée et de la conductivité du milieu traversé. Il rayonne sur une distance variable de quelques millimètres, mais son intensité chute brusquement avec la distance. Seuls les premières centaines de microns semblent réellement impacter les mesures.

D'autre part, le capteur semble être plus sensible aux variations de conductivité que celles de la permittivité électrique, compte tenu de la gamme fréquentielle de mesure. La sensibilité du capteur serait meilleure sur les fréquences inférieures à 1,0 GHz. Au-delà, l'influence de la conductivité ionique s'estompe et les courbes convergent vers une même valeur. L'impact de la permittivité diélectrique est encore trop atténué mais serait probablement plus visible au-delà de 10 GHz.

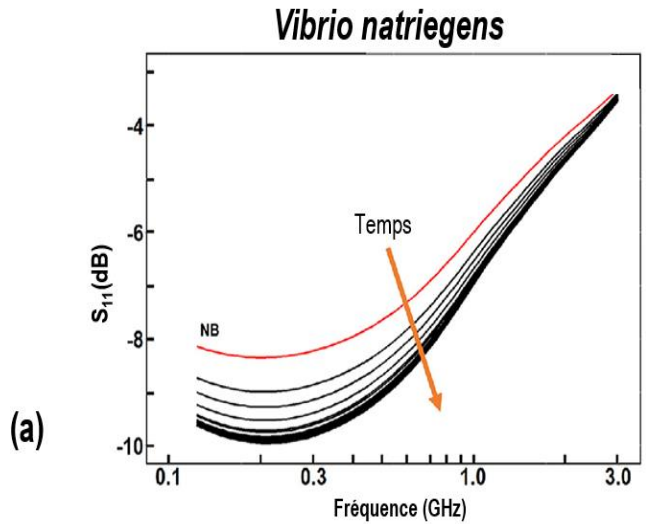
La croissance d'un biofilm provoque à la fois des changements de conductivité de la solution au cours du développement bactérien ainsi qu'une épaisseur de film hétérogène et évolutive au cours du temps. Tous ces éléments devraient en théorie avoir un impact sur le coefficient de réflexion S_{11} , d'après les simulations HFSS. La combinaison de la croissance bactérienne en suspension et la formation du biofilm est complexe à modéliser. L'évolution du coefficient de réflexion pourrait dépendre de la conductivité locale au niveau de la sonde mais aussi de l'épaisseur du film bactérien. L'effet synergique de tous ces paramètres en conditions réelles pourraient engendrer des variations conséquentes encourageant l'utilisation du capteur pour la détection des biofilms.

V. APPLICATION DU CAPTEUR SUR DES CAS REELS

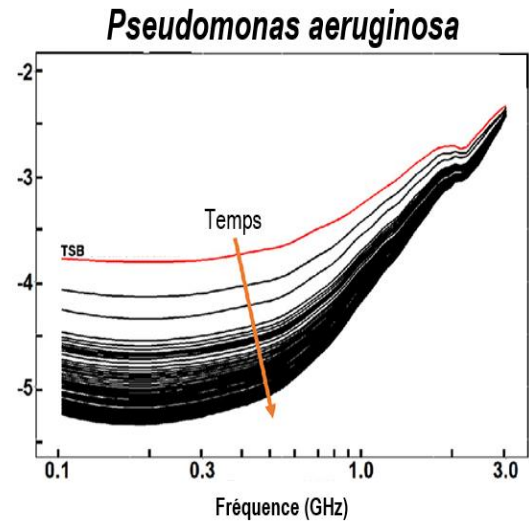
Dans cette section, le suivi de croissance de deux bactéries modèles est testé à l'aide du capteur radiofréquence. D'après les simulations HFSS, le capteur est théoriquement sensible aux variations des pertes diélectriques, autrement dit, de la conductivité électrique. Il devrait ainsi être capable de détecter des changements du coefficient S_{11} lors des modifications des caractéristiques électriques du milieu provoquées par l'expansion de la densité cellulaire.

Vibrio natriegens

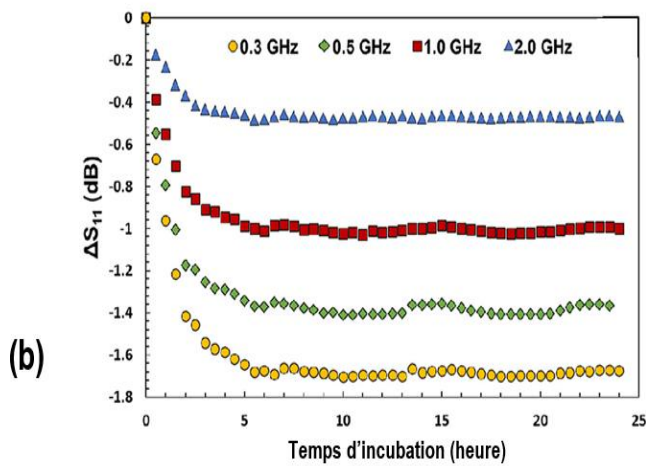
Les données recueillies par le capteur lors de la croissance de *V. natriegens* sont représentées dans la figure 40. Les graphiques a, b et c représentent respectivement la mesure du coefficient de réflexion S_{11} sur l'entièreté de la gamme de fréquence, les données extraites de 4 fréquences (0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 GHz) puis normalisées par rapport à la référence (milieu de culture abiotique) et enfin les courbes de croissances de la bactérie obtenues par mesure de densité optique et coloration au cristal violet. Dans la figure 40a, les mesures de référence du milieu de culture stérile (NB) apparaissent en rouge. Il affiche une valeur de -7,75 dB à 100 MHz avec un profil légèrement convexe en début de gamme. Les valeurs augmentent ensuite à partir de 0,3 GHz jusqu'à 3,0 GHz et atteignent une valeur maximale de -3,27 dB. Lors du développement bactérien, la dynamique est maintenue, mais les valeurs s'affaiblissent globalement. Ce comportement, également observé lors des simulations HFSS, montre que les variations de conductivité électrique sont corrélées à la hausse de la densité bactérienne, qui se traduit par une chute du coefficient S_{11} . Ce phénomène était également prédit par les simulations HFSS. La figure 40b montre le ΔS_{11} monofréquence associé à la croissance de la bactérie en fonction du temps. Sous cette représentation, les tendances observées, pour chaque fréquence chez *V. natriegens* affichent une nette diminution de la valeur ΔS_{11} pendant les deux premières heures de croissance, suivie d'un ralentissement pour atteindre une valeur constante après 6 heures. Phénomène observé sur les simulations HFSS, la sensibilité de la méthode est accrue aux basses fréquences conduisant à une vitesse de variation initiale de - 0,72 dB/h à 0,3 GHz contre - 0,22 dB/h à 2,0 GHz. La cinétique de croissance de *V. natriegens* en suspension et sa formation du biofilm sont représentés dans la figure 40c. Le développement planctonique de la bactérie dans ces conditions expérimentales est rapide (7 heures) et atteint une teneur maximale proche de 10^8 UFC.ml⁻¹. La quantité de bactéries dans la suspension reste ensuite stable. De très faibles valeurs de l'indice SBF sont mesurées indiquant une adhésion parcellaire dans les conditions du test. Ces résultats soulignent la croissance rapide de *V. natriegens* en accord avec la littérature (Hoffart *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016) mais sa formation de biofilm reste faible.



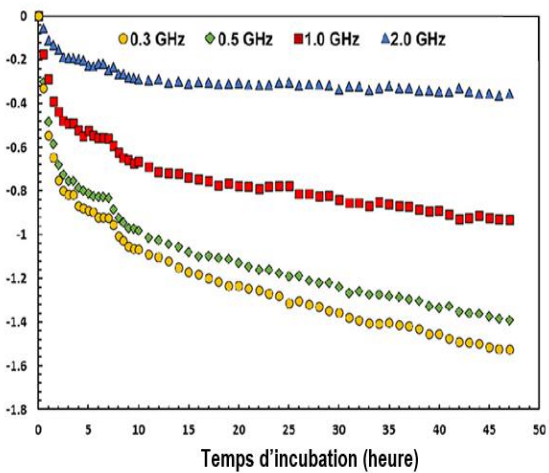
(a)



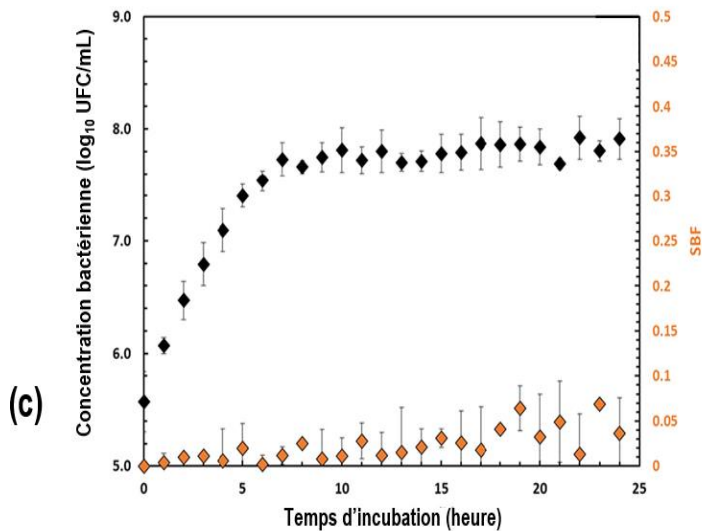
(a)



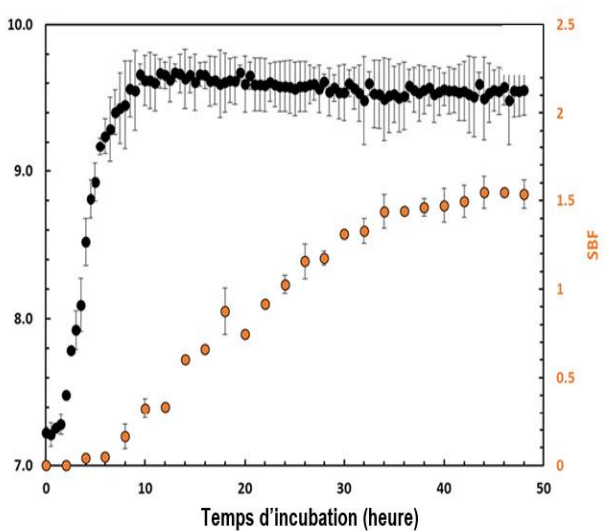
(b)



(b)



(c)



(c)

Figure 40 : Suivi de croissance de *V. natriegens* avec le capteur radiofréquence. A – Mesure du coefficient de réflexion S_{11} ; B – Variations normalisées obtenues sur 4 fréquences; C – résultats des cinétiques de croissances obtenues par mesure de densité optique et coloration au cristal violet.

Figure 41 : Suivi de croissance de *P. aeruginosa* avec le capteur radiofréquence. A – Mesure du coefficient de réflexion S_{11} ; B – Variations normalisées obtenues sur 4 fréquences; C – résultats des cinétiques de croissances obtenues par mesure de densité optique et coloration au cristal violet.

Pseudomonas aeruginosa

Une expérience similaire a été réalisée avec la bactérie *P. aeruginosa*, les données sont regroupées dans la figure 41. Semblable aux caractéristiques de la bactérie précédente, les valeurs du paramètre S_{11} de *P. aeruginosa* ont diminué au cours du développement cellulaire par rapport à la courbe de référence du milieu TSB. Les différences obtenues pour les références, en rouge, et l'allure des courbes en-deçà de 500 MHz sont attribuées aux compositions différentes des deux milieux de culture utilisés. Initialement proche de la dynamique de *Vibrio natriegens* aux stades précoces, le ΔS_{11} de *P. aeruginosa* décline progressivement vers une phase stationnaire mais une rupture de pente survient après 7 heures d'incubation. Ce phénomène ne peut être observé qu'à des fréquences inférieures à 1 GHz probablement en raison de la plus grande sensibilité du capteur observé dans cette partie de la gamme sur les simulations numériques. La sensibilité du capteur pour cette bactérie est d'environ 0,41 dB/h sur la phase linéaire initiale. Cette différence avec *V. natriegens* met en évidence la dispersion des résultats due à la nature des cellules étudiées (espèces différentes), ce qui avait déjà été partiellement discuté par Russel *et al.* (2018). En effet, les propriétés physico-chimiques des cellules bactériennes (taille, épaisseur de la membrane, rugosité) sont susceptibles de fortement influencer les mesures. Une hypothèse plausible serait que, de par leur nature, des cellules différentes ne se polarisent pas de la même manière sous l'influence d'un champ électrique. Par conséquent, les propriétés diélectriques locales du milieu ne peuvent être identiques. Ceci peut potentiellement expliquer ces différences de sensibilité, souvent omises dans les études de caractérisation électrique radiofréquence. La croissance de *P. aeruginosa* est plus lente. Il faut 8 à 10 heures pour atteindre une phase stationnaire à une concentration finale de $4,4 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹. Cette bactérie, en particulier la souche PAO1, produit en revanche une grande quantité d'EPS expliquant l'augmentation significative de l'indice SBF à partir de 6 heures d'incubation. La hausse s'atténue progressivement, jusqu'à l'obtention d'un plateau autour de 44 heures de croissance. Les différentes phases identifiées par le paramètre S_{11} aux basses fréquences semblent corrélées aux types de croissance des bactéries (planctonique et adhésion). La chute initiale pourrait en effet correspondre à la croissance des bactéries en suspension. La phase suivante semble liée à l'adhésion bactérienne visible sur le test de coloration au cristal violet qui pourrait également s'effectuer sur la sonde. Une seconde hypothèse serait que cette adhésion correspond à la rupture de pente observée après 7 heures de croissance. Bien que les conditions expérimentales diffèrent entre les deux tests, cette valeur concorde temporellement avec la détection du biofilm par la technique de coloration au cristal violet. Ensuite, les deux processus de croissance sont simultanés entre 7 et 10 heures d'incubation, correspondant à la fin de la phase de croissance en suspension des bactéries et à un potentiel épaissement du biofilm.

Ces résultats démontrent le potentiel de cette méthode pour le suivi en temps réel de la croissance d'un biofilm mono-espèce. La croissance bactérienne initiale de *V. natriegens* provoque une diminution globale de 1,45 dB à 0,3 GHz. Au cours de cette période, la densité bactérienne a augmenté de $2,0 \times 10^5$ à $3,2 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹ sur le test de croissance, correspondant à une pente de 0,95 dB/log(DO₆₀₀). Les travaux de Narang *et al.* (2018) exploitent le potentiel d'un résonateur microfluidique en anneau à micro-ondes pour détecter la présence d'*E. coli* dans un milieu liquide sous différentes conditions de pH. Une sensibilité maximale de 0,4771 dB/log (DO₆₀₀) a été atteinte, deux fois plus faible que celle obtenue avec le capteur présenté dans ce manuscrit.

Ces résultats soulignent le potentiel du capteur à suivre une croissance bactérienne mais également la formation d'un biofilm dans un milieu de culture, en conditions statiques. Afin d'appuyer davantage les preuves de l'efficacité de la méthode, une expérience complémentaire visant à isoler la formation du biofilm a été réalisée. Trois mesures ont été réalisées sur des cultures des deux souches précédentes au moment de l'inoculation, après 24 et 48h de croissance. Contrairement aux mesures précédentes, le milieu de culture a été renouvelé en amont de la caractérisation radiofréquence. Chaque renouvellement élimine les bactéries planctoniques, ne laissant place qu'aux cellules adhérentes. La figure 42A montre les valeurs de S₁₁ mesurées pour *V. natriegens* qui confirment l'absence d'adhésion car les courbes n'évoluent pas. En ce qui concerne *P. aeruginosa*, les résultats de la figure 42B indiquent un déclin global des valeurs de S₁₁ expliqué par la présence et le développement d'un film adhérent sur la sonde. La diminution du paramètre S₁₁ sur les 48 heures est d'environ 0,51 dB à 0,3 GHz ce qui est très proche de la variation de S₁₁ mesurée dans la figure 41B entre le point de rupture de pente, à 6 heures de croissance, à la fin de l'expérience. L'impact de l'expansion du biofilm sur la réponse du capteur est donc bien établi et cela confirme que les deux types de croissances, planctoniques et biofilm, sont bien présents pendant la croissance des bactéries dans le réservoir du capteur. Il s'agit d'un élément de réponse supplémentaire aux hypothèses émises concernant le point de rupture observé. La pente qui suit semble quant à elle être liée à l'évolution de l'épaisseur du biofilm. Dans ce cas, la sensibilité spécifique du biofilm serait égale à - 0.012 dB/h à la fréquence de 0.3 GHz.

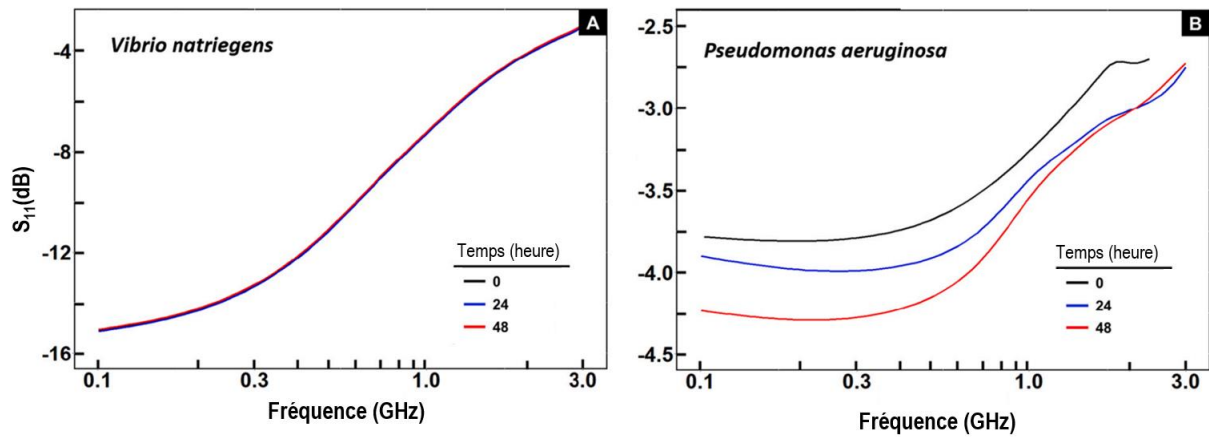


Figure 42 : Détermination de la formation du biofilm par renouvellement de milieu.

Bien que les biofilms se développent théoriquement sur toutes les surfaces du réservoir, les cinétiques de développement peuvent être différentes si la sonde se trouve sur la paroi verticale ou au niveau du socle principal. Pour vérifier cette hypothèse, un capteur comportant deux sondes a été conçu. Comme illustré dans la figure 43, une sonde a été inclinée d'un angle de 90° et positionnée sur la paroi du réservoir. Afin d'augmenter les vitesses d'acquisition, des mesures ont été réalisées directement à 300 MHz, fréquence pour laquelle la sensibilité de la méthode est élevée.



Figure 43 : Photographies du capteur à deux sondes (extérieur/intérieur).

Un EPS (MO245) a été solubilisé dans le milieu TSB et son impact est étudié avec ce capteur. Il contient entre autres des unités répétées de tétrasaccharides composées de glucose, de galactose et de rhamnose (Martin-Pastor *et al.*, 2019). Sa présence dans le milieu de culture implique la formation d'une couche d'EPS aux propriétés anti-biofilm sur la surface du réservoir (Martin-Pastor *et al.*, 2019). Ainsi, en plus du changement de position de la sonde, l'efficacité des mesures au travers d'un revêtement anti-biofilm sera évaluée. Des mesures préliminaires dans un milieu de culture abiotique ont permis d'évaluer l'impact négligeable du film polysaccharidique sur la réponse du capteur.

L'objectif de cette étude est d'observer quelle serait la réponse obtenue si les bactéries n'étaient pas en mesure de coloniser la sonde et d'étudier l'impact de l'inclinaison de cette dernière sur les résultats. La figure 44 regroupe les données obtenues lors de ces analyses. La courbe noire, sur les trois graphiques, représente la croissance de *P. aeruginosa* sur la sonde placée sur sa position initiale dans des conditions classiques. Le point de rupture de pente vers 8 heures d'incubation marque la colonisation de la sonde par les bactéries. La courbe rouge est une mesure réalisée dans des conditions similaires avec la seconde sonde positionnée sur la paroi du réservoir. Les niveaux initiaux et finaux sont attendus, mais un décalage temporel de la rupture de pente est visible. Dans cette configuration, la sonde semble détecter la présence d'un biofilm avec un délai supplémentaire de quatre heures, si la rupture de pente est considérée comme la limite de détection du biofilm. Ces résultats mettent en avant les différences de dynamique de formation du biofilm dans un système statique en fonction d'un positionnement horizontal ou vertical de la sonde.

La courbe verte représente une analyse effectuée lors du développement bactérien dans un milieu TSB contenant l'EPS MO245. L'ajout au préalable de cet EPS forme une couche protectrice sur toutes les parois immergées qui est censée empêcher la colonisation bactérienne. La disparition du point de rupture, probablement caractéristique de la formation d'un biofilm, semble corrélée avec les propriétés anti-biofilm de l'EPS. Cependant, les valeurs finales obtenues, avec ou sans EPS, sont identiques indiquant que les propriétés électriques finales des solutions sont similaires dans les deux cas. Les EPS utilisés semblent prévenir la formation d'un biofilm sur les parois, n'excluant pas la possibilité d'une formation à l'interface liquide-air pouvant ensuite se propager dans le liquide. Cette hypothèse a pu être validée lors du nettoyage post-analyse du capteur. Un mucus non adhérent aux parois était présent en solution. Aucun autre élément de validation de cette hypothèse n'est malheureusement disponible à ce jour.

La combinaison des deux paramètres étudiés (position verticale et présence de l'EPS MO245) est représentée par la courbe bleue révélant une dynamique proche de la précédente. C'est un élément soutenant les preuves que les parois verticales du réservoir sont également protégées par l'EPS. Semblable à la mesure précédente, un mucus bactérien non adhérent s'est développé en solution mais la sonde ne semble pas discriminer un biofilm adhérent et suspendu. En conclusion, l'efficacité de l'EPS est validée par la méthode hyperfréquence. En effet, l'adhésion du biofilm sur les parois du capteur a été inhibée par le polysaccharide, probablement en raison de sa présence sous la forme d'une microcouche sur les surfaces immergées. De plus, le positionnement du capteur a mis en évidence le délai de colonisation entre la surface horizontale et verticale.

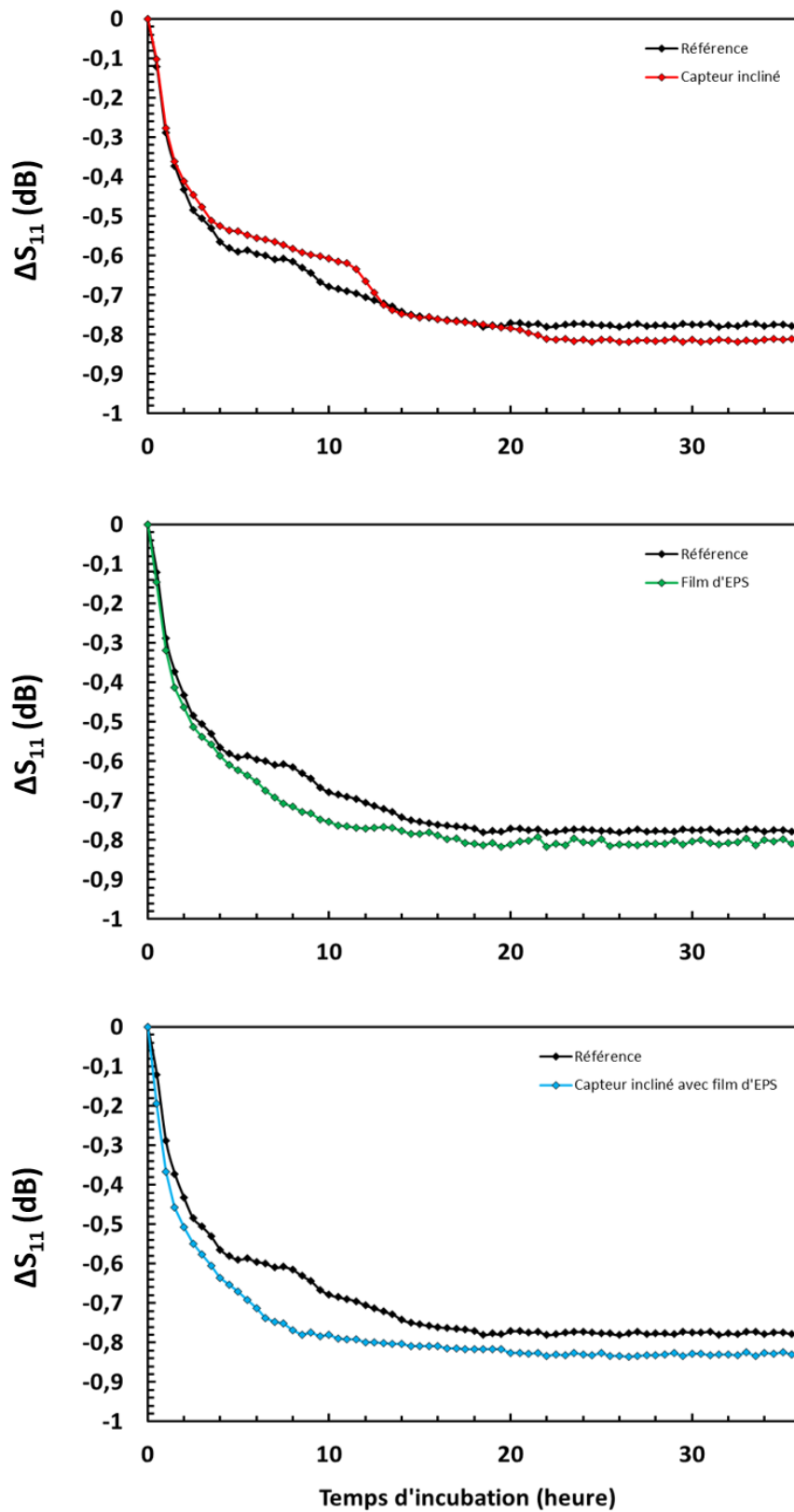


Figure 44 : Impact du positionnement de la sonde et du revêtement de l'EPS MO245 sur la réponse du capteur pendant la croissance de *P. aeruginosa*.

VI. CONCLUSIONS

Le développement d'un capteur basé sur la réflexion des ondes électromagnétiques a été présenté afin de suivre la croissance de deux bactéries modèles et la formation d'un biofilm en temps réel. Le principe du capteur est basé sur la technologie des sondes coaxiales et permet de générer un champ électrique depuis l'âme coaxiale vers la ceinture en laiton. Les analyses des caractéristiques diélectriques des composants majeurs des biofilms (différents sucres et cellules microbiennes) indiquent que les cellules microbiennes influencent fortement les pertes diélectriques, intimement reliées à la conductivité globale du milieu, en rééquilibrant les charges ioniques par diffusion au travers de la membrane cellulaire. Ce phénomène est visible sur les basses fréquences, inférieures à 1 GHz. La production d'EPS par les bactéries pourrait engendrer des variations de la permittivité relative à haute fréquence (au-delà de 6 GHz). La gamme de fréquence validée par le matériel commercial ne permet pas d'effectuer des mesures au-delà de 3,0 GHz, rendant l'exploitation des variations de permittivité relative difficile. Les simulations HFSS soutiennent la forte sensibilité du capteur aux variations de conductivité locales aux fréquences de la gamme 0,1 – 1,0 GHz qui est davantage adaptée au matériel utilisé.

Il est crucial de pouvoir détecter les biofilms à leur stade précoce en raison de leur impact économique, sanitaire et environnemental. Ce capteur ainsi que la méthode proposée dans ce chapitre peuvent répondre aux besoins urgents de contrôler l'apparition de biofilms. L'un des axes d'amélioration clé à entreprendre serait d'effectuer une étude complète en système dynamique en introduisant des flux constants. De nombreuses informations complémentaires pourraient être acquises et le système serait comparable à certaines méthodes actuelles utilisées, par exemple en industrie agroalimentaire, avec l'incorporation de systèmes microfluidiques dans les circuits et bioréacteurs. Les applications fondamentales en microbiologie sont de trouver de nouveaux traitements antimicrobiens avec de faibles taux de résistance pour prévenir l'apparition de maladies, de biofouling ou de biocorrosion. Ce capteur apporte une solution de détection rapide à ce problème et peut être utilisé dans de nombreux domaines pour soutenir d'autres techniques dans les systèmes de prévention des biofilms.

REFERENCES

- Abi Nassif, L., Rioual, S., Farah, W., Hellio, C., Fauchon, M., Trepos, R., Abboud, M., Diler, E., Thierry, D., Lescop, B., 2020. Reduction of potential ennoblement of stainless steel in natural seawater by an ecofriendly biopolymer. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 103609.
- Allydice-Francis, K., Brown, P.D., 2012. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int. J. Microbiol.* 2012.
- Andryieuski, A., Kuznetsova, S.M., Zhukovsky, S.V., Kivshar, Y.S., Lavrinenko, A.V., 2015. Water: Promising opportunities for tunable all-dielectric electromagnetic metamaterials. *Sci. Rep.* 5, 1–9.
- Azeredo, J., Oliveira, H., Costa, A.R., Shneider, M., Sillankorva, S., 2018. Bacteriophage polysaccharide depolymerases, their role and biotechnological applications.
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., Schröder, U., 2015. Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2048–2055.
- Behzadi, P., Baráth, Z., Gajdács, M., 2021. It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 10, 42.
- Behzadi, P., Behzadi, E., 2008. The microbial agents of urinary tract infections at central laboratory of Dr. Shariati Hospital, Tehran, Iran. *Turk Klin Tip Bilim* 28, 445.
- Behzadi, P., Urbán, E., Gajdács, M., 2020. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases* 8, 17.
- Ben-Yoav, H., Freeman, A., Sternheim, M., Shacham-Diamand, Y., 2011. An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms. *Electrochimica Acta* 56, 7780–7786.
- Bobowski, J.S., Johnson, T., 2020. Permittivity measurements of biological samples by an open-ended coaxial line. *ArXiv Prepr. ArXiv200707343*.
- Bono Jr, M.S., Ahner, B.A., Kirby, B.J., 2013. Detection of algal lipid accumulation due to nitrogen limitation via dielectric spectroscopy of *Chlamydomonas reinhardtii* suspensions in a coaxial transmission line sample cell. *Bioresour. Technol.* 143, 623–631.
- Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P.Ø., Høiby, N., 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–15.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., 2019. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front. Microbiol.* 913.
- Clark, S.T., Diaz Caballero, J., Cheang, M., Coburn, B., Wang, P.W., Donaldson, S.L., Zhang, Y., Liu, M., Keshavjee, S., Yau, Y.C., 2015. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 5, 1–10.
- Eagon, R.G., 1962. *Pseudomonas natriegens*, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes. *J. Bacteriol.* 83, 736–737.
- Erian, A.M., Freitag, P., Gibisch, M., Pflügl, S., 2020. High rate 2, 3-butanediol production with *Vibrio natriegens*. *Bioresour. Technol. Rep.* 10, 100408.
- Gajdács, M., Burián, K., Terhes, G., 2019. Resistance levels and epidemiology of non-fermenting gram-negative bacteria in urinary tract infections of inpatients and outpatients (RENFUTI): a 10-year epidemiological snapshot. *Antibiotics* 8, 143.
- Geredew Kifelew, L., Mitchell, J.G., Speck, P., 2019. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. *Biofouling* 35, 472–481.
- Giorgi-Pérez, A.M., Arboleda-Ordoñez, A.M., Villamizar-Suárez, W., Cardeñosa-Mendoza, M., Jaimes-Prada, R., Rincón-Orozco, B., Niño-Gómez, M.E., 2021. Biofilm formation and its effects on microbiologically influenced corrosion of carbon steel in oilfield injection water via electrochemical techniques and scanning electron microscopy. *Bioelectrochemistry* 141, 107868.
- Grenier, K., Dubuc, D., Poleni, P.-E., Kumemura, M., Toshiyoshi, H., Fujii, T., Fujita, H., 2009. New broadband and contact less RF/microfluidic sensor dedicated to bioengineering, in: 2009 IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest. IEEE, pp. 1329–1332.
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., 2012. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS One* 7, e31698.
- Gun, L., Ning, D., Liang, Z., 2017. Effective permittivity of biological tissue: comparison of theoretical model and experiment. *Math. Probl. Eng.* 2017.
- Gurney, J., Pradier, L., Griffin, J.S., Gougat-Barbera, C., Chan, B.K., Turner, P.E., Kaltz, O., Hochberg, M.E., 2020. Phage steering of antibiotic-resistance evolution in the bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol. Med. Public Health* 2020, 148–157.
- Hall, A.R., De Vos, D., Friman, V.-P., Pimay, J.-P., Buckling, A., 2012. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5646–5652.

- Hanlon, G.W., 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 118–128.
- Hoff, J., Daniel, B., Stukenberg, D., Thuronyi, B.W., Waldminghaus, T., Fritz, G., 2020. *Vibrio natriegens*: an ultrafast-growing marine bacterium as emerging synthetic biology chassis. *Environ. Microbiol.* 22, 4394–4408.
- Hoffart, E., Grenz, S., Lange, J., Nitschel, R., Müller, F., Schwentner, A., Feith, A., Lenfers-Lücker, M., Takors, R., Blombach, B., 2017. High substrate uptake rates empower *Vibrio natriegens* as production host for industrial biotechnology. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e01614-17.
- Holloway, B.W., Egan, J.B., Monk, M., 1960. Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 38, 321–330.
- Hussein, M.I., Jithin, D., Rajmohan, I.J., Sham, A., Saeed, E.E.M., AbuQamar, S.F., 2019. Microwave characterization of hydrophilic and hydrophobic plant pathogenic fungi using open-ended coaxial probe. *IEEE Access* 7, 45841–45849.
- Jaiswal, A., Koley, H., Ghosh, A., Palit, A., Sarkar, B., 2013. Efficacy of cocktail phage therapy in treating *Vibrio cholerae* infection in rabbit model. *Microbes Infect.* 15, 152–156.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81, 7–11.
- Jayaraman, A., Cheng, E.T., Earthman, J.C., Wood, T.K., 1997. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 11–17.
- Josh, M., Clennell, B., 2015. Broadband electrical properties of clays and shales: Comparative investigations of remolded and preserved samples. *Geophysics* 80, D129–D143.
- Kassinger, S.J., Van Hoek, M.L., 2020. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synth. Syst. Biotechnol.* 5, 1–10.
- Kellenberger, G., Kellenberger, E., 1957. Electron microscopical studies of phage multiplication: III. Observation of single cell bursts. *Virology* 3, 275–285.
- Klockgether, J., Tümmler, B., 2017. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research* 6.
- Krishnaveni, P., Ganesh, V., 2021. Electron transfer studies of a conventional redox probe in human sweat and saliva bio-mimicking conditions. *Sci. Rep.* 11, 1–13.
- Kuwahara, Y., Nakada, Y., Nozaki, A., Fujii, K., 2019. Measurement and Analysis of Complex Permittivity of Breast Cancer in Microwave Band, in: 2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). *IEEE*, pp. 2929–2932.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543.
- Lee, H.H., Ostrov, N., Wong, B.G., Gold, M.A., Khalil, A.S., Church, G.M., 2016. *Vibrio natriegens*, a new genomic powerhouse. *BioRxiv* 058487.
- Liu, L., Xu, Y., Cui, F., Xia, Y., Chen, L., Mou, X., Lv, J., 2018. Monitoring of bacteria biofilms forming process by in-situ impedimetric biosensor chip. *Biosens. Bioelectron.* 112, 86–92.
- Loges, L.A., Silva, D.B., Paulino, G.V., Landell, M.F., Macedo, A.J., 2020. Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo. *Microb. Pathog.* 143, 104066.
- Love, M.J., Bhandari, D., Dobson, R.C., Billington, C., 2018. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. *Antibiotics* 7, 17.
- Mansour, R., Rioual, S., Lescop, B., Talbot, P., Abboud, M., Farah, W., Tanné, G., 2020. Development of a resonant microwave sensor for sediment density characterization. *Sensors* 20, 1058.
- Martellosio, A., Pasian, M., Bozzi, M., Perregrini, L., Mazzanti, A., Svelto, F., Summers, P.E., Renne, G., Preda, L., Bellomi, M., 2016. Dielectric properties characterization from 0.5 to 50 GHz of breast cancer tissues. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 65, 998–1011.
- Martínez-Alemán, S., Bustamante, A.E., Jimenez-Valdes, R.J., González, G.M., Sánchez-González, A., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients induce neutrophil extracellular traps with different morphologies that could correlate with their disease severity. *Int. J. Med. Microbiol.* 310, 151451.
- Martin-Pastor, M., Ferreira, A. S., Moppert, X., Nunes, C., Coimbra, M. A., Reis, R. L., ... & Novoa-Carballal, R. (2019). Structure, rheology, and copper-complexation of a hyaluronan-like exopolysaccharide from *Vibrio*. *Carbohydrate polymers*, 222, 114999.
- Maruthupandy, M., Anand, M., Maduraiveeran, G., Beevi, A.S.H., Priya, R.J., 2015. Electrical conductivity measurements of bacterial nanowires from *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 045007.
- Maurice, N.M., Bedi, B., Sadikot, R.T., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58, 428–439.
- Mavrovic, A., Roy, A., Royer, A., Filali, B., Boone, F., Pappas, C., Sonnentag, O., 2018. Dielectric characterization of vegetation at L band using an open-ended coaxial probe. *Geosci. Instrum. Methods Data Syst.* 7, 195–208.

- Mohd Bahar, A.A., Zakaria, Z., Isa, A.A.M., Dasril, Y., Alahnomi, R.A., 2019. Real time microwave biochemical sensor based on circular SIW approach for aqueous dielectric detection. *Sci. Rep.* 9, 1–12.
- Narang, R., Mohammadi, S., Ashani, M.M., Sadabadi, H., Hejazi, H., Zarifi, M.H., Sanati-Nezhad, A., 2018. Sensitive, real-time and non-intrusive detection of concentration and growth of pathogenic bacteria using microfluidic-microwave ring resonator biosensor. *Sci. Rep.* 8, 1–10.
- Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M.C., Soriano, F., 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J. Appl. Microbiol.* 105, 585–590.
- Haase, N.M., Fuge, G., Trieu, H.K., Zeng, A.-P., Jacob, A.F., 2015. Miniaturized transmission-line sensor for broadband dielectric characterization of biological liquids and cell suspensions. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 63, 3026–3033.
- Oh, M., Kim, Y., Park, J., 2007. Factors affecting the complex permittivity spectrum of soil at a low frequency range of 1 kHz–10 MHz. *Environ. Geol.* 51, 821–833.
- Ojinnaka, C.M., Ajenka, J.A., Abayeh, O.J., Osuji, L.C., Duru, R.U., 2016. Formulation of best-fit hydrophile/lipophile balance-dielectric permittivity demulsifiers for treatment of crude oil emulsions. *Egypt. J. Pet.* 25, 565–574.
- Oliveira, H., São-José, C., Azeredo, J., 2018. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy. *Viruses* 10, 292.
- Palleroni, N.J., 2010. The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.*
- Payne, W.J., 1958. Studies on bacterial utilization of uronic ACIDS III: Induction of Oxidative Enzymes in a Marine Isolate. *J. Bacteriol.* 76, 301–307.
- Peltonen, J., Murtomaa, M., Robinson, K., Salonen, J., 2018. The electrical resistivity and relative permittivity of binary powder mixtures. *Powder Technol.* 325, 228–233.
- Piekarz, I., Górska, S., Odrobina, S., Drab, M., Wincza, K., Gamian, A., Gruszczynski, S., 2020. A microwave matrix sensor for multipoint label-free *Escherichia coli* detection. *Biosens. Bioelectron.* 147, 111784.
- Poma, N., Vivaldi, F., Bonini, A., Salvo, P., Kirchhain, A., Melai, B., Bottai, D., Tavanti, A., Di Francesco, F., 2020. A graphenic and potentiometric sensor for monitoring the growth of bacterial biofilms. *Sens. Actuators B Chem.* 323, 128662.
- Pye, C., 2018. *Pseudomonas otitis* externa in dogs. *Can. Vet. J.* 59, 1231.
- Raju, R., Bridges, G.E., Bhadra, S., 2020. Wireless passive sensors for food quality monitoring: Improving the safety of food products. *IEEE Antennas Propag. Mag.* 62, 76–89.
- Russel, M., Sophocleous, M., JiaJia, S., Xu, W., Xiao, L., Maskow, T., Alam, M., Georgiou, J., 2018. High-frequency, dielectric spectroscopy for the detection of electrophysiological/biophysical differences in different bacteria types and concentrations. *Anal. Chim. Acta* 1028, 86–95.
- Schwan, H.P., 1983. Electrical properties of blood and its constituents: Alternating current spectroscopy. *Blut Z. Für Gesamte Blutforsch.* 46, 185–197.
- Stuchly, M.A., Kraszewski, A., Stuchly, S.S., Smith, A.M., 1982. Dielectric properties of animal tissues in vivo at radio and microwave frequencies: comparison between species. *Phys. Med. Biol.* 27, 927.
- Turgul, V., Kale, I., 2018. Permittivity extraction of glucose solutions through artificial neural networks and non-invasive microwave glucose sensing. *Sens. Actuators Phys.* 277, 65–72.
- Weinstock, M.T., Heseck, E.D., Wilson, C.M., Gibson, D.G., 2016. *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. *Nat. Methods* 13, 849–851.
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *nature* 442, 368–373.
- Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranyake, L., Weerasekera, M., 2019. Influence of laboratory culture media on in vitro growth, adhesion, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med. Princ. Pract.* 28, 28–35.
- Wu, H., Wei, Y., Guo, X., Liu, H., Chang, R., Shan, H., Zuo, Y., 2016. Dielectric Property Study of *Bacillus cereus* Spores at Microwave Frequency Region, in: *Proceedings of the 2015 International Conference on Communications, Signal Processing, and Systems*. Springer, pp. 773–780.
- Zhao, Y., Zhou, E., Liu, Y., Liao, S., Li, Z., Xu, D., Zhang, T., Gu, T., 2017. Comparison of different electrochemical techniques for continuous monitoring of the microbiologically influenced corrosion of 2205 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Corros. Sci.* 126, 142–151.

CHAPITRE III

Elaboration d'un nouveau modèle électrochimique

I.	INTRODUCTION	132
II.	MATERIELS ET METHODES	134
1.	CULTURES CELLULAIRES	134
2.	CARACTERISATION ELECTROCHIMIQUE.....	135
2.1.	<i>Préparation de l'électrode de GC et fabrication de la cellule électrochimique</i>	<i>135</i>
2.2.	<i>Paramètres expérimentaux</i>	<i>136</i>
2.3.	<i>Observations au microscope électronique à balayage</i>	<i>136</i>
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	137
1.	SUIVI DU POTENTIEL CIRCUIT OUVERT	137
1.1.	<i>Concentration initiale nulle</i>	<i>137</i>
1.2.	<i>Impact de la concentration initiale sur le suivi de l'E_{oc}.....</i>	<i>140</i>
1.3.	<i>Effet de la température sur l'OCP</i>	<i>141</i>
2.	VOLTAMPEROMETRIE CYCLIQUE.....	143
3.	SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE	145
IV.	CONCLUSIONS	150
	REFERENCES	151

I. INTRODUCTION

Le capteur radiofréquence élaboré dans le chapitre précédent a permis de suivre avec succès la croissance et la formation du biofilm de *P. aeruginosa* en temps réel, sur une gamme fréquentielle allant de 100 MHz à 3 GHz. Des capteurs électrochimiques utilisant des fréquences plus faibles, de l'ordre du kilohertz, ont également fait l'objet d'études approfondies pour mesurer des croissances cellulaires (Wang *et al.*, 2022 ; Zarabadi *et al.*, 2017). Jusqu'à présent, la plupart des études électrochimiques sur les biofilms se sont concentrées sur la variation du potentiel de circuit ouvert (E_{OC}) en fonction du temps afin de surveiller la croissance du film, ce qui représente un outil commun pour la surveillance des biofilms sur les aciers (Abi Nassif *et al.*, 2020). La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) a été utilisée plus rarement, bien qu'elle apporte des informations supplémentaires sur les propriétés interfaciales en termes de capacités et de résistances par rapport aux techniques hyperfréquences classiques. Dans la plupart des travaux publiés, la colonisation bactérienne a été étudiée sur des surfaces en acier (Giorgi-Pérez *et al.*, 2021; Jayaraman *et al.*, 1997), révélant une diminution de l' E_{OC} en fonction du temps lors de la formation du biofilm. Ce décalage négatif du potentiel de circuit ouvert a pu être corrélé à l'augmentation de la densité bactérienne (Giorgi-Pérez *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2017). En outre, les études EIS ont démontré que la résistance globale de transfert de charge de l'électrode pouvait être diminuée lors de la croissance du biofilm (Giorgi-Pérez *et al.*, 2021). Bien que ces études électrochimiques aient fourni des tendances générales, les phénomènes mis en jeu sont encore difficiles à expliquer, notamment en raison de la présence d'interférences de mesures provoquées par la passivation des aciers par la formation du biofilm. De plus, la distinction entre la croissance cellulaire et la formation du biofilm n'est pas toujours bien définie dans les études électrochimiques mentionnées précédemment. Sur la base de ces travaux antérieurs, la nécessité de développer des systèmes modèles permettant une interprétation plus approfondie de la croissance du biofilm apparaît comme un verrou essentiel à lever. L'utilisation d'électrodes avec des matériaux inertes tels que le carbone vitreux (GC) à la place de l'acier est une stratégie qui pourrait permettre de s'affranchir des contraintes de l'acier (essentiellement des phénomènes de passivation) (Poma *et al.*, 2020). Les travaux de Poma se sont récemment concentrés sur le lien entre la variation de l' E_{OC} avec la croissance bactérienne sur une électrode en oxyde de graphène. À l'identique des électrodes en acier, une diminution du potentiel de circuit ouvert a été observée. Néanmoins, leurs expériences ont été réalisées sur des temps de croissance courts, trop faibles pour permettre la formation d'un biofilm et sa présence n'a pu être mise en évidence expérimentalement.

Dans ce contexte, ce chapitre décrit une étude détaillée de la colonisation bactérienne et de la formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur une électrode de GC pendant trois jours. L'objectif est de fournir un nouveau modèle pour la croissance de biofilms sur des surfaces inertes qui pourrait être utilisé pour des études futures et potentiellement comparables à des surfaces en acier. Les résultats seront également utilisés afin de compléter les données obtenues avec le capteur radiofréquence, en adoptant une approche différente pour l'étude de la croissance d'un biofilm type. Des techniques électrochimiques variées (surveillance du potentiel en circuit ouvert, EIS et voltampérométrie cyclique (CV)) ainsi que la microscopie électronique à balayage (MEB) ont été utilisées pour analyser les surfaces modifiées aux différents stades de la croissance du biofilm. Ces techniques ont été combinées à des tests biologiques afin de corréler les observations à la concentration bactérienne et la quantité de biofilm formé.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Cultures cellulaires

La bactérie modèle gram-négative *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a été choisie en raison de sa capacité importante à former des biofilms dans les conditions de culture de cette étude. Elle a été inoculée à partir d'un stock congelé dans deux tubes en téflon contenant 50 ml de milieu Tryptic Soy Broth (TSB). La souche a ensuite été incubée pendant une nuit à 37°C afin d'atteindre une saturation maximale en bactéries mobiles (100%), à environ 10^{10} CFU/ml. L'un des deux tubes a été dilué pour atteindre un taux de saturation en bactérie de 10%. Trois conditions de départ pourront être testées : inoculation d'un milieu de culture stérile et début des tests à partir des suspensions saturées à 10 et 100%.

Pour les tests débutants en milieu abiotique, 150 μ l de suspension bactérienne ont été inoculés dans 20 ml de milieu de culture TSB. Pour s'assurer de la conformité des cinétiques de croissance cellulaire et de formation du biofilm, les tests biologiques de marquage au cristal violet ainsi que le suivi de croissance au spectrophotomètre ont été réitérés. Pour ce faire, la préculture a été inoculée dans 60 ml de TSB pour atteindre une concentration de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml. Cette suspension a ensuite été employée pour réaliser des suivis de croissance bactérienne :

Toutes les 30 minutes pendant 48 h, 500 μ l de milieu ont été collectés et la DO_{600} a été mesurée (8 répétitions) en utilisant un spectrophotomètre TECAN Infinite™. La cinétique de formation du biofilm a été évaluée par marquage des cellules adhérentes avec du cristal violet dans des plaques en polystyrène (Greiner Bio-one®) de 96 puits. Dans chaque plaque, les bactéries ont été inoculées dans 200 μ l de milieu de culture TSB. Le marquage de la matière adhérente a été effectué en ajoutant 50 μ l d'une solution de cristal violet dans chacun des puits. Après 10 minutes, le contenu des puits a été retiré et un lavage très délicat a été effectué en trempant les plaques dans un bain d'eau distillée. Enfin, 200 μ l d'éthanol ont été ajoutés pour solubiliser les cellules adhérentes colorées. La détermination des valeurs de formation spécifique de biofilm (SBF) a été calculée selon la méthode de Naves *et al.* (2008) décrite dans le chapitre précédent.

2. Caractérisation électrochimique

2.1. Préparation de l'électrode de GC et fabrication de la cellule électrochimique

L'électrode en carbone vitreux (GC) ($A = 0,071 \text{ cm}^2$) a été achetée chez CHI (modèle CHI104). Afin d'obtenir une surface homogène pour chaque expérience, elle a d'abord été polie sur du papier émeri (P600). Après avoir été rincée à l'eau, elle a été polie sur un tissu d'alumine ($1 \mu\text{m}$), rincée à l'eau, nettoyée dans un bain à ultrasons et séchée avec un courant d'air.

La cellule électrochimique a été fabriquée sur mesure pour ces expériences. Trois raccords en verre, destinés à accueillir chacun une électrode, ont été conjointés en Y. Chaque embout possède un pas de vis auquel un bouchon percé associé d'un joint maintiennent les électrodes en place. Afin d'assurer une température stable au sein de la cellule, un réservoir à deux embouchures (entrée / sortie) a été ajouté pour y faire circuler l'eau à 37°C . Une photographie de la cellule électrochimique montre le système à trois électrodes en fonctionnement dans la cellule thermostatée sur la figure 45A. Les mesures sont réalisées dans une cage de faraday afin de supprimer les éventuelles perturbations électromagnétiques extérieures. La figure 45B représente une version modifiée de la cellule électrochimique à vide où les embouchures du système de chauffe ont été décalées en biais pour limiter l'accumulation de bulles d'air qui privent le système d'un chauffage optimal.

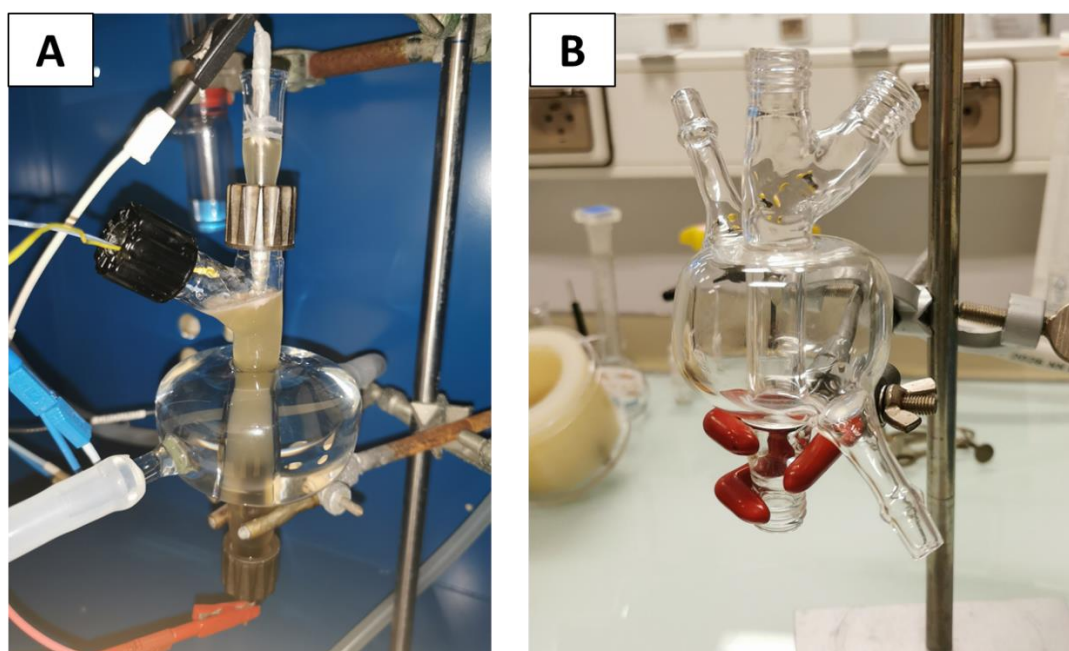


Figure 45 : Photographie du dispositif électrochimique : A - Système à trois électrodes en fonctionnement au sein de la cage de faraday ; B - Cellule électrochimique à vide.

2.2. Paramètres expérimentaux

Une configuration classique à trois électrodes a été utilisée dans toutes les expériences électrochimiques. L'électrode de travail (WE) est une électrode en carbone vitreux positionnée à la verticale par l'embouchure basse (figure 45A). La contre-électrode (CE) est un fil de platine placé en biais par la partie supérieure de la cellule électrochimique. L'électrode de référence (RE) est une électrode de chlorure d'argent (Ag/AgCl, KCl, 3M ; $E = + 0.210$ V vs. SHE à 25°C) fixée à la verticale sur la partie haute de la cellule. Les mesures électrochimiques (contrôle de l'OCP, voltampérométrie cyclique (CV) et spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)) ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat SP200 (Bio-logic) ou d'un appareil PGSTAT30 (Metrohm). Trois réplicas ont été enregistrés pour chaque mesure d'OCP. Deux températures ont été testées : $19^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et 37°C . Une période d'équilibre a été effectuée avant chaque suivi d'OCP. La CV et l'EIS ont été obtenues dans une solution de ferricyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_3$ (0,5 mM) / KCl (0,1 M) / H_2O . Les mesures EIS ont été effectuées sur une gamme de fréquence de 100 kHz à 10 mHz, avec une amplitude de 10 mV pour respecter la linéarité du système. Le potentiel appliqué a été fixé au potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ déterminé à partir des mesures CV dans la solution de ferricyanure.

2.3. Observations au microscope électronique à balayage

Des feuilles de graphite de 0,5 mm d'épaisseur (Goodfellow, 99,8%) ont été plongées dans une solution de TSB chargée en bactéries pendant 5 et 24 heures. En parallèle, deux pièces de GC ont été extraites d'une électrode de travail inutilisable. Elles ont été immergées dans une suspension bactérienne pendant 3 et 24 heures. L'analyse morphologique des bactéries présentes sur les feuilles de graphite et le GC a été réalisée à l'aide d'un microscope SEM Hitachi - S800. Pour une meilleure résolution, quelques gouttes d'une solution de HILEM IL1000 ont été déposées sur les échantillons. Des dizaines d'observations ont été réalisées. Les images les plus représentatives ont été sélectionnées pour illustrer les résultats.

2.4. Analyses statistiques

Les mesures d'OCP ont été réalisées en trois réplicas. Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne des trois répétitions et l'écart type est représenté par des aires colorées autour des courbes. Les mesures d'impédance électrochimique ont été répétées trois fois pour chaque échantillon. Une analyse de la variance ANOVA a été réalisée avec un seuil de confiance de 95% ($P\text{-value} < 0,05$) sur le logiciel R© (version 3.6.1). Aucune différence significative n'a été détectée.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Suivi du potentiel circuit ouvert

1.1. Concentration initiale nulle

Les mesures du potentiel en circuit ouvert à l'électrode en GC ont été effectuées à 37°C afin de respecter les conditions de mesures employées dans le chapitre précédent. La figure 46 montre la variation de l' E_{OC} en fonction du temps dans le milieu de culture TSB ainsi que la concentration bactérienne et l'indice SBF. Trois étapes peuvent être observées et décrites comme suit :

- De 0 à 1 heure, la variation de potentiel est faible ($< 2 \text{ mV.h}^{-1}$).
- Une diminution significative d'environ 30 mV.h^{-1} se produit jusqu'à environ 6 heures d'incubation.
- La chute du potentiel en circuit ouvert ralentit lentement (2 mV.h^{-1}) mais ne tend pas vers une stabilisation du signal jusqu'à la fin du test.

Ces résultats soulignent une bonne corrélation entre la variation de l' E_{OC} et la croissance des bactéries en suspension ainsi que la formation du biofilm. La phase de latence observée dans un cycle classique de croissance bactérienne (Loges *et al.*, 2020) correspond aux premiers instants de la croissance bactérienne, lorsque la densité cellulaire n'a pas encore atteint une évolution exponentielle ce qui semble coïncider avec la stagnation du signal OCP lors de la première heure. Ensuite, la forte diminution du potentiel observée à l'étape suivante peut être associée à la croissance planctonique exponentielle. D'après les cinétiques de croissance planctonique, la densité cellulaire se stabilise à partir de 6 heures de croissance et la concentration maximale est atteinte après 10 heures puis n'évolue plus par la suite. C'est à ce moment précis que la dynamique de l' E_{OC} change et ralentit sa progression. Mais c'est également à cet instant, lorsque la rupture de l' E_{OC} est observée, que l'évolution de l'indice spécifique de formation du biofilm débute, marqueur de l'émergence des premières étapes d'adhésion des cellules bactériennes.

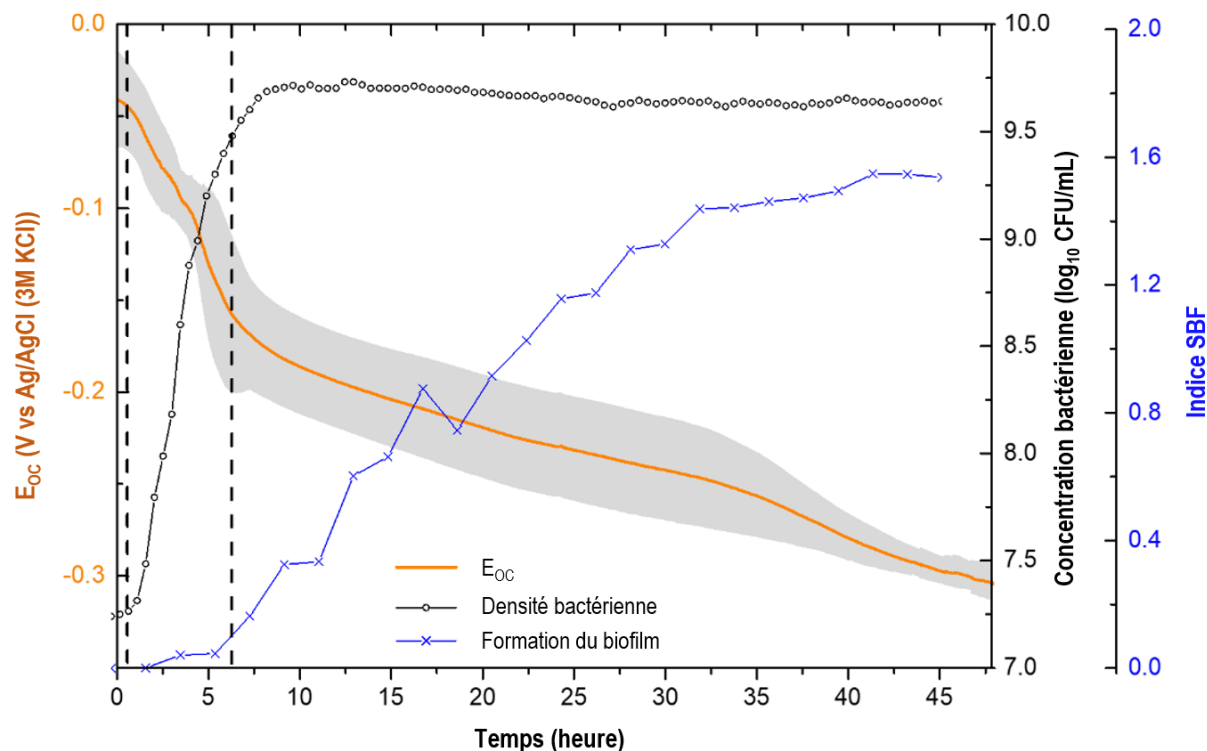


Figure 46 : Comparaison du suivi OCP (axe de gauche) à la croissance bactérienne et la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (axe de droite) à 37°C. La courbe orange est une moyenne de quatre enregistrements de l' E_{OC} au cours du temps dont le nuage gris représente l'écart type.

Afin de confirmer les hypothèses des différentes phases observées, des observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées. L'adhésion bactérienne a été identifiée sur une feuille de graphite et des morceaux de GC. Les propriétés chimiques du carbone vitreux et du graphite sont similaires, mais les surfaces ne sont pas identiques, notamment au niveau de la rugosité. Le graphite, plus rugueux, devrait favoriser l'adhésion bactérienne, en général plus importante dans les matériaux possédant de nombreux interstices. Néanmoins, l'objectif de ces observations n'est pas de quantifier l'adhésion bactérienne mais dans un premier temps de prouver son existence sur des matériaux carbonés et en particulier l'électrode de travail.

La figure 47 représente des images réalisées au MEB lors des observations des feuilles de graphite et des éclats de GC après les étapes d'immersion. Dans un premier temps, après 3 à 5 heures de croissance, les deux surfaces sont exemptes de bactéries. D'autres images non présentées soulignent la présence de bactéries isolées, notamment sur les feuilles de graphite, mais leur nombre reste très faible. Après 24 heures d'immersion, les surfaces carbonées sont entièrement recouvertes de bactéries. La matrice d'EPS est clairement visible sur chaque image, à l'instar de ce qui a été observé par Wijesinghe (2019).

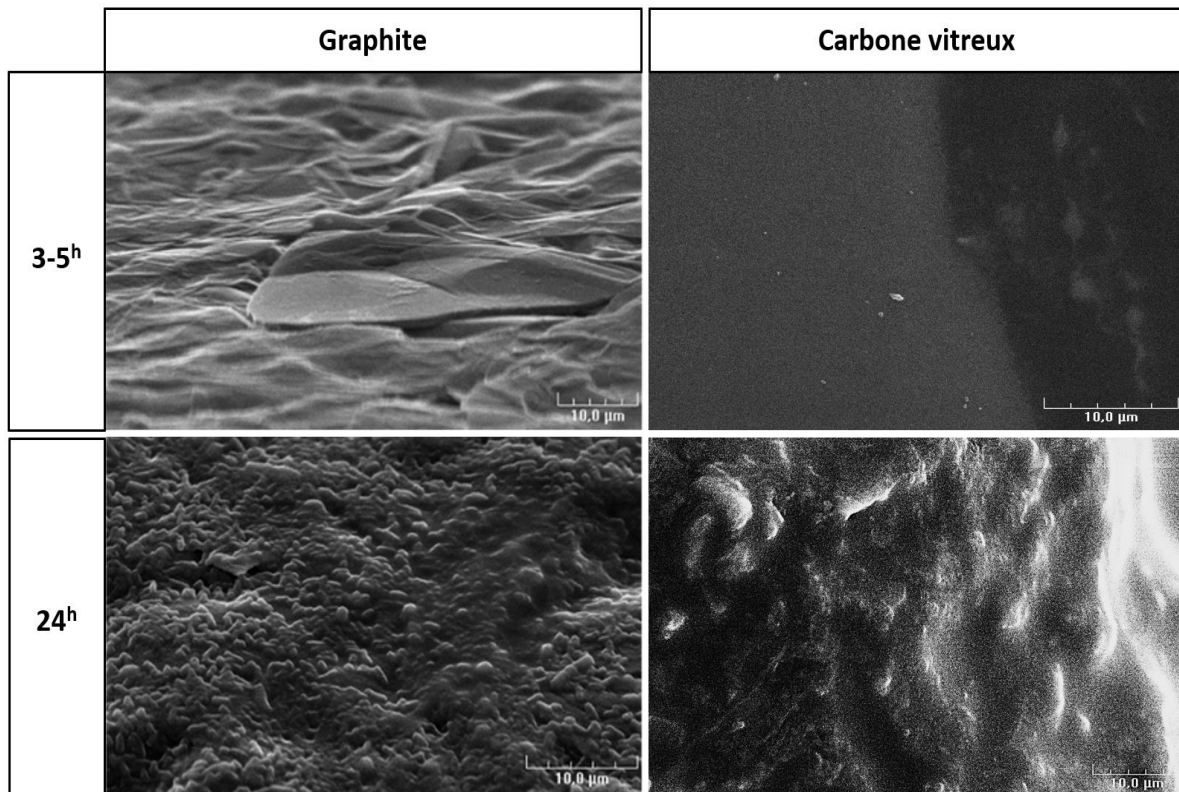


Figure 47 : Images des feuilles de graphite immergées en présence de *P. aeruginosa* au microscope électronique à balayage.

Ainsi, ces observations au MEB mettent clairement en évidence une forte colonisation bactérienne sur les échantillons carbonés. Ce phénomène indique que les bactéries sont en capacité de coloniser une surface carbonée telle que l'électrode de travail. Mais il reste néanmoins difficile d'estimer le taux de recouvrement bactérien de l'électrode de travail au cours du temps. La variation d'OCP observée pourrait correspondre à la hausse de la densité bactérienne dans le milieu ainsi qu'aux modifications des paramètres physicochimiques du milieu de culture. Les variations de la dynamique de l' E_{OC} lorsque l'indice SBF augmente semblent liées à l'apparition d'une colonisation bactérienne sur l'électrode de GC. Il est évident que la colonisation est bien différente de celle observée avec le capteur radiofréquence dans le chapitre précédent puisque les conditions de croissance ne sont pas identiques (réservoir, substrat, méthode d'incubation, etc.). Néanmoins, le suivi OCP d'une croissance bactérienne en environnement statique donne des résultats comparables à ceux du capteur en termes de dynamique des signaux électriques. A partir des données électrochimiques et des observations microscopiques réalisées, la chronologie du processus peut être résumée comme suit :

- Une étape d'initiation/latence pour laquelle l' E_{OC} est stable. La densité cellulaire est faible et quelques bactéries éparpillées sont présentes,
- Une diminution significative de l' E_{OC} lorsque la densité cellulaire augmente significativement. La présence d'une colonisation précoce ne peut être confirmée ou infirmée à ce stade. Cela peut inclure l'adsorption ou le dépôt progressif de bactéries sur la surface de l'électrode,
- Lorsque la concentration bactérienne est maximale et qu'une colonisation importante est probable, l'OCP présente une chute plus faible mais constante.

1.2. Impact de la concentration initiale sur le suivi de l' E_{OC}

Afin de déterminer plus précisément les paramètres qui affectent la formation du biofilm sur l'électrode inerte, différentes concentrations bactériennes initiales ont été testées et les valeurs de l' E_{OC} ont été suivies. Le suivi du potentiel en circuit ouvert réalisé pour trois conditions de départ différentes est présenté dans la figure 48. La première condition a été décrite dans la section précédente et correspond à la courbe orange. Le milieu TSB est inoculé avec 150 μ l de suspension bactérienne. La courbe verte représente la concentration bactérienne maximale atteinte. La courbe bleue représente une concentration initiale de bactéries égale à 10% de la densité cellulaire maximale.

Ces résultats donnent lieu à un comportement en 3 étapes pour lequel l' E_{OC} présente une forte dépendance vis-à-vis de la concentration en bactéries (courbe orange). Lorsque les électrodes sont immergées dans une suspension bactérienne saturée (courbe verte), aucune phase de latence n'est visible et le potentiel en circuit ouvert diminue instantanément. Le potentiel de l'électrode semble entièrement dépendre de la concentration locale de bactéries à la surface de l'électrode de GC. Jusqu'à 6 heures d'incubation, la diminution du potentiel se stabilise progressivement (10 mV.h^{-1}). Ce phénomène peut être interprété par l'hypothèse selon laquelle les cellules bactériennes colonisent dans ce cas rapidement la surface de l'électrode de travail. Les caractéristiques physicochimiques du milieu de culture évoluent d'un extrême à l'autre en quelques secondes occasionnant une dynamique brutale lors des premières minutes de suivi de l'OCP. A partir de 10 heures de suivi, la courbe verte n'évolue presque pas. Il est probable qu'une colonisation rapide de l'électrode de GC ait lieu dans ces conditions et conduise à des conditions stables plus rapidement que dans des croissances classiques.

En situation intermédiaire, avec une suspension saturée à 10% (courbe bleue), la dynamique de variation de l' E_{OC} est comparable à celle obtenue initialement (courbe orange). L'hypothèse émanant de ces observations suggère qu'il existe une valeur seuil de densité cellulaire en dessous de laquelle l'évolution du potentiel est indépendante du nombre de bactéries. La densité cellulaire est en constante augmentation tant que la solution n'est pas saturée ou qu'il n'y ait aucune limitation nutritive. L'adsorption des cellules à la surface de l'électrode reste progressive expliquant la similitude de la dynamique de l' E_{OC} avec la première condition. L'OCP étant une méthode extrêmement sensible, il est difficile d'émettre une hypothèse solide pour tenter d'apporter une explication aux écarts des valeurs de départ des différentes courbes qui varient légèrement.

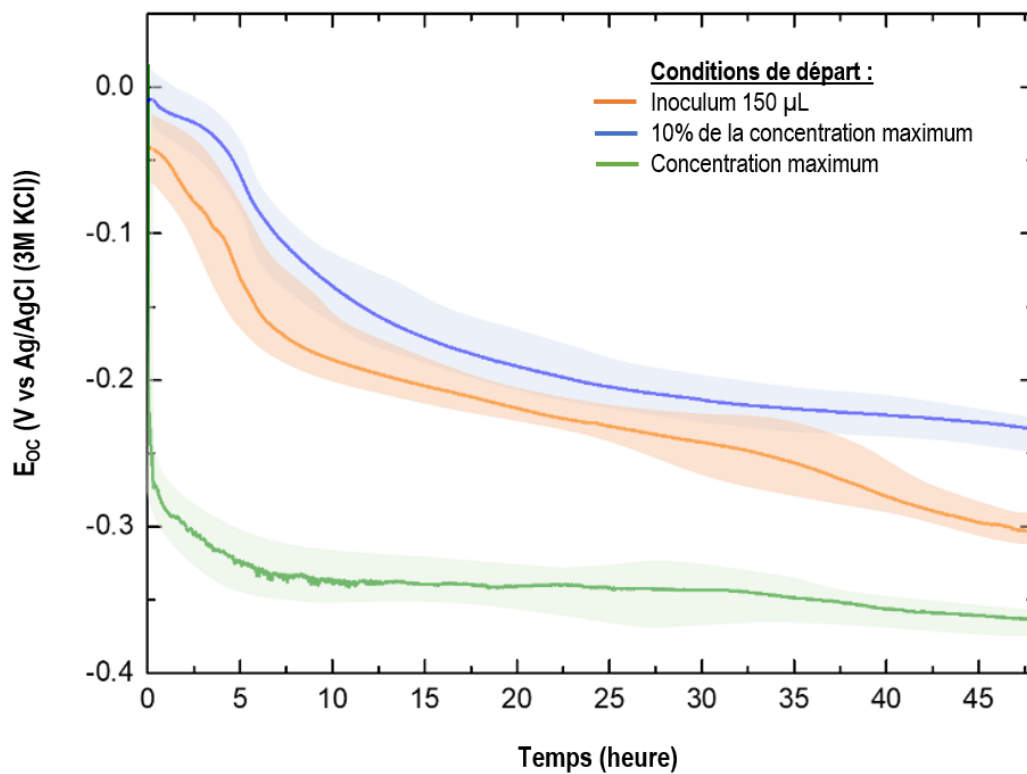


Figure 48 : Enregistrement du potentiel de circuit ouvert au cours du temps à partir de trois conditions de départ différentes : saturation en bactérie <1%, 10% et 100%.

1.3. Effet de la température sur l'OCP

Le suivi électrochimique de l'OCP a été testé à température ambiante ($19\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) dans les mêmes conditions que le chapitre précédent. En théorie, la diminution de la température ralentit les processus de division cellulaire mais peut, suite à un stress thermique, accélérer la formation du biofilm. L'objectif de cette expérience est de retarder les processus de croissance afin de mieux définir chacune des étapes détectées précédemment. La figure 49 montre le suivi de l' E_{OC} en fonction du temps à $19\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le comportement du potentiel observé correspond aux hypothèses émises précédemment, la diminution de l' E_{OC} est plus lente. Dans ce cas précis, la croissance planctonique ainsi que la formation du biofilm se recouvrent temporellement, bien plus qu'à 37°C. La première quinzaine d'heures dévoile une très faible variation du potentiel ($< 2\text{mV}\cdot\text{h}^{-1}$). Jusqu'à 70 heures, le potentiel chute significativement d'environ $4\text{mV}\cdot\text{h}^{-1}$. Il pourrait s'agir d'une colonisation accélérée de l'électrode de travail. Une étape plus courte de 70 à 77 heures de croissance révèle un déclin brutal de l' E_{OC} , proche de $20\text{mV}\cdot\text{h}^{-1}$, coïncidant avec l'amplification de l'indice de formation du biofilm mesuré à cette température. La fin de l'expérience affiche une pente négative de faible ampleur, comparable au profil final de la courbe à 37 °C de la figure 46.

A température ambiante, les cinétiques de croissance indiquent que le développement du biofilm débute bien avant que la suspension soit saturée en cellules planctoniques. La formation précoce du biofilm par rapport au développement planctonique peut être une réponse des bactéries aux conditions de culture. Les exopolymères qui composent la majorité de la matrice du biofilm ont de nombreuses fonctions, dont un rôle de préservation des cellules contre des conditions de développement difficiles. La production des EPS peut être déclenchée précocement dans des conditions de stress environnemental tel qu'une température plus faible (Wijesinghe *et al.*, 2019). Ainsi, la chute du potentiel entre 15 et 70 heures de croissance peut être attribuée, dans ces conditions, à la fois à la hausse de densité cellulaire et à une adhésion cellulaire sur l'électrode de travail.

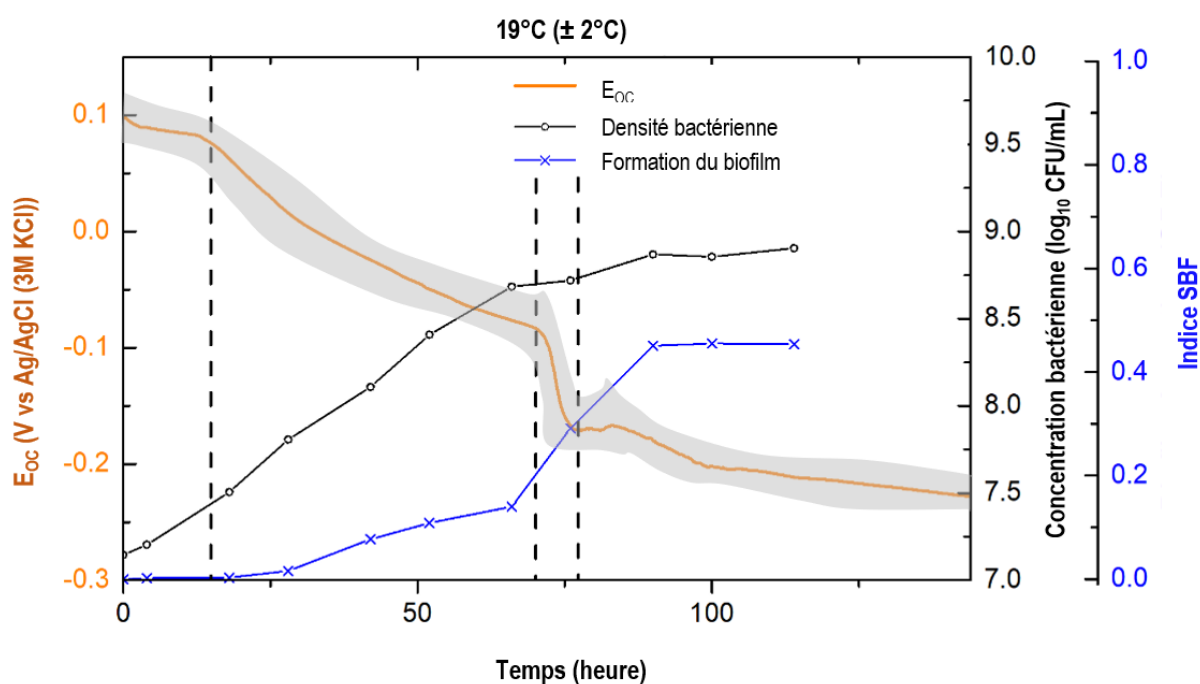


Figure 49 : Comparaison du suivi OCP (axe de gauche) à la croissance bactérienne et la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (axe de droite) à 19°C ± 2°C.

En conclusion, l'ensemble de ces expériences apportent des informations cruciales sur la colonisation des électrodes par les bactéries et les dynamiques de potentiel en circuit ouvert observées. D'une part, comme avec la méthode radiofréquence, le monitoring d'une croissance bactérienne mono-espèce via l'OCP donne une courbe qui semble corrélée à la fois à une croissance en suspension et la formation d'un biofilm. Les courbes de croissance réalisées à part peuvent en effet expliquer les différentes phases observées. Mais cette hypothèse ne peut être valable que si *P. aeruginosa* est en mesure de coloniser une surface carbonée extrêmement lisse telle que la surface de l'électrode de travail. Ce point critique a pu être vérifié grâce aux observations au MEB. De plus, le système électrochimique semble répondre rapidement à des changements brusques de densité cellulaire. Bien qu'une immersion dans des solutions nutritives contenant peu de cellules bactériennes donne des suivis aux dynamiques similaires, les mesures réalisées dans un milieu saturé provoque une chute brutale du signal. Il est probable que la colonisation de l'électrode soit plus rapide dans ces conditions car les cellules bactériennes seraient plus nombreuses à être en contact avec le substrat en GC.

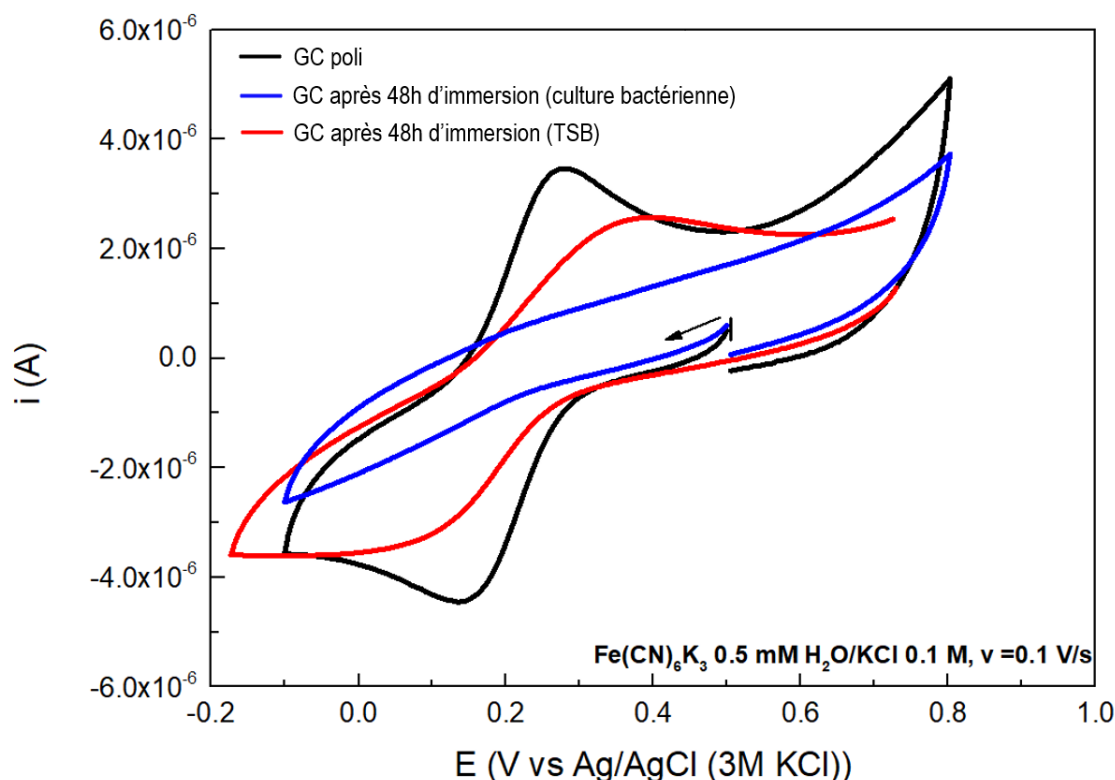
Néanmoins, bien que le développement de la bactérie à une température de 19°C semble être ralenti, cela ne donne aucune information sur la cinétique de colonisation de l'électrode de GC. A ce stade, aucune information n'indique que la formation du biofilm des différentes conditions expérimentales étudiées et lors du test de croissance au cristal violet sont identiques. Le suivi de potentiel en circuit ouvert seul n'apporte pas assez d'informations pour permettre de discriminer le développement bactérien global de la colonisation de l'électrode de travail par un biofilm.

2. Voltampérométrie cyclique

Des mesures complémentaires à l'OCP ont été effectuées dans le but d'accroître la compréhension du système et de construire un modèle électrochimique cohérent. Une dizaine de mesures de CV et EIS ont été effectuées permettant l'acquisition de nombreuses informations sur les propriétés conductrices de la surface de l'électrode couverte par un biofilm. Pour ces deux techniques, un milieu redox de ferricyanure a été utilisé pour permettre la détermination et la visualisation directe de la cinétique de transfert d'électrons aux interfaces électrode-biofilm-solution. Les résultats obtenus par voltampérométrie cyclique sont présentés dans la figure 50. La courbe noire correspond à l'électrode de GC polie, exempte d'espèces adsorbées. Un système quasi-réversible correspondant au système ferri/ferro de la solution de ferricyanure est obtenu et

précédemment rapporté dans différents travaux publiés (Baudler *et al.*, 2015; Krishnaveni & Ganesh, 2021).

Après immersion de l'électrode de GC dans le milieu de culture avec présence de *P. aeruginosa* pendant 48 heures, la courbe bleue résultante ne présente aucun pic. Ce comportement typique d'une couche isolante qui bloque le transfert d'électrons vers l'électrode souligne l'effet résistif du biofilm, probablement provoqué par la matrice polysaccharidique comme observé récemment avec une couche organique liée de manière covalente (Krishnaveni & Ganesh, 2021). La surface de l'électrode a été conditionnée par les cellules adhérentes, phénomène cohérent avec la colonisation bactérienne observée dans la figure 47. Par conséquent, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la couche de biofilm formée à la surface de l'électrode inhiberait le transfert de charge. Ces observations sont particulièrement inattendues car les bactéries sont connues pour être des espèces conductrices, comme l'ont montré les travaux de Maruthupandy *et al.* (2015) avec des techniques électrochimiques similaires (CV et EIS). Cependant, certaines études ont également mis en évidence le comportement isolant de la matrice du biofilm qui pourrait être expliqué par la présence des polysaccharides (Ben-Yoav *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018).



Pour étudier l'influence éventuelle du milieu de culture sur les résultats de CV du biofilm, une électrode polie a été immergée dans un milieu TSB abiotique pendant 4 heures. La courbe rouge correspondante dans la figure 50 montre un comportement redox différent par rapport au GC poli. En l'absence de bactéries dans la solution, une couche solidement adsorbée pourrait se déposer à court terme sur le GC, ralentissant le transfert d'électrons. Ce phénomène avait été pris en compte dans les expériences de suivi d'OCP et justifie le temps d'équilibrage mis en place avant chaque mesure, bien que l' E_{OC} n'ait mis en évidence aucun changement significatif lors de cette phase. Ainsi, cette couche adsorbée n'affecte pas significativement le potentiel en circuit ouvert, mais est bien présente dans le système. Ce processus n'a jamais été, à notre connaissance, mentionné dans la littérature mais il a été intégré au nouveau modèle proposé dans ce travail.

3. Spectroscopie d'impédance électrochimique

Les mesures EIS dans le ferricyanure ont été effectuées en parallèle des mesures CV afin de mieux analyser le processus de transfert d'électrons en termes de courants capacitifs et faradiques. Les conditions d'analyse sur GC poli, du GC immergé dans du milieu TSB abiotique et du GC recouvert d'un biofilm ont été étudiées. Les données expérimentales sont représentées par des diagrammes classiques de Nyquist dans la figure 51 et de Bode dans la figure 52. Les diagrammes de Nyquist ont été ajustés selon un circuit équivalent comprenant la résistance de l'électrolyte (R_e), la résistance de transfert de charge (R_{ct}), la pseudo-capacité à double couche (Q_{dl}) pour le transfert d'électrons ferri/ferrocyanure ainsi que deux composants parallèles de type résistance/capacité qui représentent le biofilm et la couche adsorbée suggérés par les expériences CV (figure 53). Le tableau 8 rassemble les données EIS obtenues à partir de l'ajustement des courbes expérimentales aux calculs théoriques issus du modèle électrochimique construit (figure 54).

Les tracés de Nyquist de l'électrode de GC polie (courbe noire, figure 51) montrent une boucle capacitive pour les hautes fréquences (> 1 Hz) conférant une résistance de transfert de charge $R_{ct} = 0,65 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ et une capacité de double couche $Q_{dl} = 40,6 \text{ }\mu\text{F} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^2$. Concernant les fréquences plus faibles, une variation linéaire avec une pente de 45° est obtenue indiquant un régime modéré par les transferts de masse (diffusion de Warburg). Un tel comportement est cohérent pour un processus de transfert de charge relativement rapide et sans couche bloquante observée sur les analyses de CV.

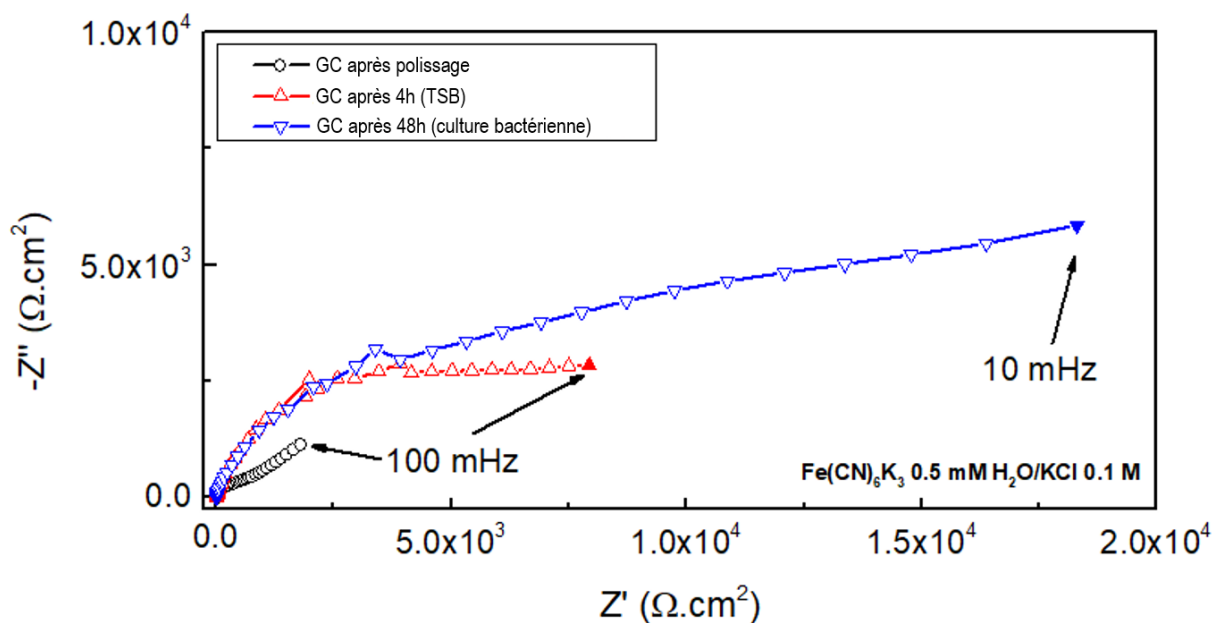


Figure 51 : Diagramme de Nyquist obtenu pour le carbone vitreux dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ lors de différentes conditions. $T = 19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

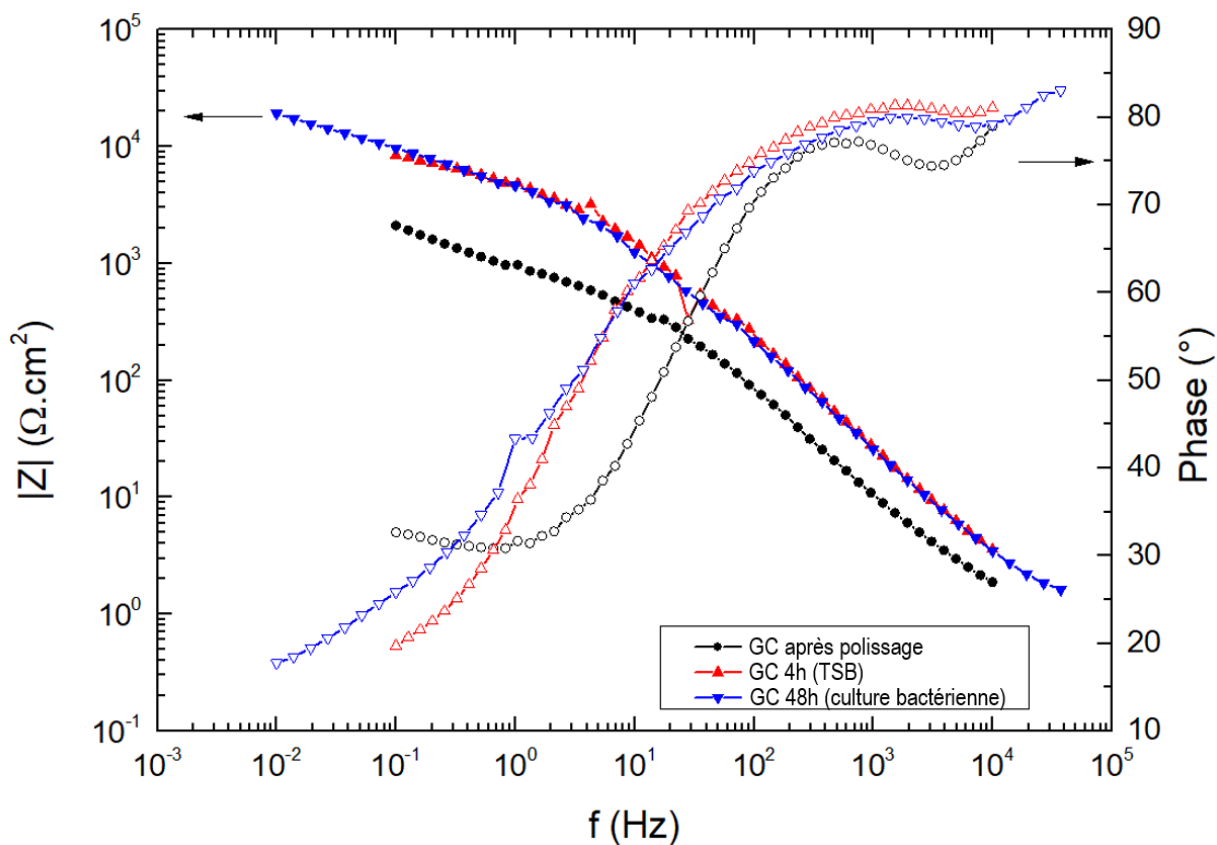


Figure 52 : Diagramme de Bode obtenu pour le carbone vitreux dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ lors de différentes conditions. $T = 19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Tableau 8 : Paramètres EIS obtenus à partir de l'ajustement des courbes expérimentales utilisant le circuit équivalent proposé en figure 53 pour une électrode immergée dans un milieu de culture TSB avec différentes densités cellulaires.

	R_e ($k\Omega.cm^2$)	$Q_{biofilm}$ ($\mu F.s^{-1}.cm^{-2}$)	$\alpha_{biofilm}$	$R_{biofilm}$ ($k\Omega.cm^2$)	Q_{ads} ($\mu F.s^{-1}.cm^{-2}$)	α_{ads}	R_{ads} ($k\Omega.cm^2$)	Q_{dl} ($\mu F.s^{-1}.cm^{-2}$)	α_{dl}	R_{ct} ($k\Omega.cm^2$)
TSB (4h)	0.008	/	/	/	17.0	0.88	4.8	165.5	0.65	7.1
Biofilm	0.006	1584.5	1	7.9	18.4	0.87	4.8	136.5	0.72	8.6

Lorsque l'électrode est immergée dans un milieu abiotique pendant 4 heures, la résistance de transfert de charge R_{ct} augmente jusqu'à 7,1 $k\Omega.cm^2$. Ce résultat est cohérent avec la formation d'une couche bloquante telle que la couche adsorbée provoquée par la présence des éléments nutritifs du milieu de culture. Lorsque l'électrode a été mise en contact avec les cellules bactériennes, la résistance de transfert de charge s'est avérée plus élevée (8,6 $k\Omega.cm^2$). Ces résultats sont tout à fait en accord avec la CV et renforcent l'hypothèse qu'une couche adsorbée et isolante se forme pendant l'étape d'équilibre dans du milieu TSB stérile. L'étude approfondie de l'analyse EIS a permis de déterminer les résistances et les pseudo-capacités pour le biofilm et les couches adsorbées en premier lieu selon le circuit équivalent présenté dans la figure 53b.

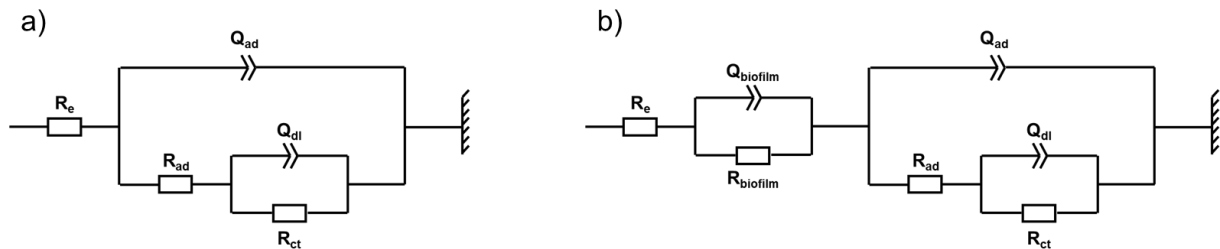


Figure 53 : Circuits équivalents proposés pour un système abiotique (a) et revêtu d'un biofilm (b).

Les valeurs d'impédance du biofilm ($R_{biofilm}$, Tableau 7) indiquent que le biofilm n'est pas un élément conducteur dans ces conditions. Les travaux de Liu *et al.* sur le sujet soulignent l'augmentation de la résistance du biofilm observée au fil du temps et confirment ces résultats (Liu *et al.*, 2018), bien que le modèle proposé soit plus simple puisqu'il ne tient pas compte de la couche adsorbée du milieu de culture. La propriété isolante est très probablement due à la matrice du biofilm, qui contient des polysaccharides, connus pour leur pouvoir isolant (Ben-Yoav *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018). Le modèle EIS obtenu à partir du circuit équivalent proposé est représenté dans la figure 54. Ces calculs théoriques s'ajustent aux courbes expérimentales prouvant que le modèle établi fonctionne correctement pour cette étude précise. Les valeurs des composants du modèle électrique calculées pour correspondre aux données expérimentales (tableau 7) représentent l'une des solutions possibles parmi l'ensemble des modèles équivalents proposés dans d'autres travaux.

En ce qui concerne le suivi de l' E_{OC} montré dans la figure 46, les données EIS suggèrent qu'en l'absence de bactéries, l'interface électrode GC - électrolyte TSB subit des processus d'adsorption, sans affecter de manière significative le potentiel en circuit ouvert. Lorsque la concentration de bactéries augmente, le nombre d'unités bactériennes adsorbées sur l'électrode en constante augmentation induit une diminution du potentiel en circuit ouvert, probablement en raison des groupes phosphates et sulfates des parois cellulaires chargés négativement. La génération d'un biofilm par les bactéries pourrait être responsable de la diminution de la conductivité globale des deux couches. L'hypothèse expliquant ces observations serait que ces changements de conductivité affecteraient l' E_{OC} qui atteindrait une valeur d'équilibre à laquelle la concentration en bactéries, l'épaisseur du biofilm et les propriétés conductrices n'évoluent plus (figure 55).

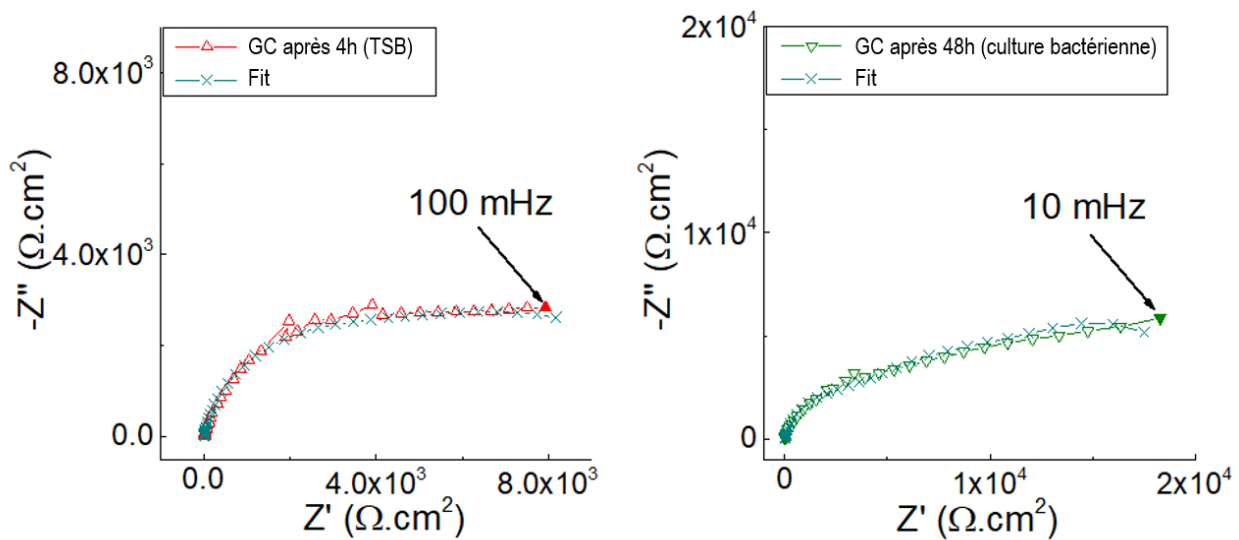


Figure 54 : Diagramme de Nyquist obtenu à l'aide du circuit équivalent proposé superposé des données expérimentales.

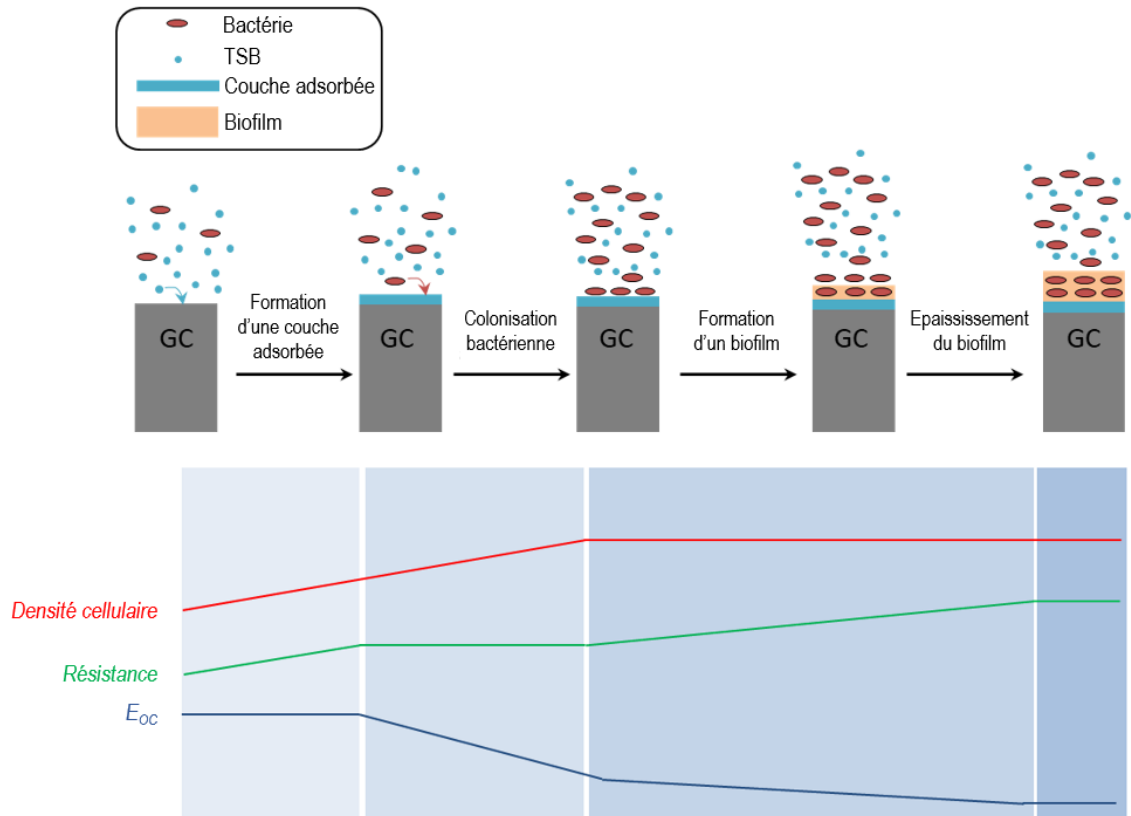


Figure 55 : Mécanisme chronologique proposé basé sur les données expérimentales obtenues à 37°C.

IV. CONCLUSIONS

Ce travail visait à fournir de nouvelles informations sur la colonisation bactérienne et la formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur une surface de GC dans un milieu TSB. La détection *in situ* du potentiel en circuit ouvert combinée à des mesures *ex situ* EIS, CV et MEB ont fourni de nouvelles informations sur les différents processus de génération du biofilm. Alors que les mesures *in situ* à long terme ont clairement souligné que l'EIS coïncidait avec l'augmentation de la densité cellulaire, les expériences de CV et d'impédance ont démontré la possible formation d'une couche isolante sur l'électrode avant le dépôt des bactéries et la formation du biofilm dans le TSB. Les propriétés conductrices des différentes couches (couche isolante et biofilm) ont été déterminées séparément à partir des mesures EIS. D'autres modèles électrochimiques différents de celui proposé dans ce travail peuvent tout aussi bien, voir mieux, correspondre aux observations expérimentales. Néanmoins, l'acceptabilité des modèles complexes est souvent remise en cause car les phénomènes physiques qu'ils impliquent (associés aux modèles électriques équivalents) sont peu probables par rapport à ceux du système étudié. Le modèle proposé dans ce chapitre est en accord avec les données de la littérature obtenues expérimentalement sur les biofilms qui apportent des éléments de validation aux hypothèses émises.

Ces résultats ouvrent la discussion sur les impacts de ces couches adsorbées sur les méthodes de mesures impliquant des champs électriques. La couche formée par le milieu de culture pourrait être cruciale pour le dépôt ultérieur de bactéries accompagné d'une chute du potentiel en circuit ouvert. Ces effets d'adsorption et de conditionnement des surfaces sont particulièrement visibles par les techniques électrochimiques, car l'utilisation de fréquences faibles (mHz) et l'architecture du système électrochimique accroissent fortement la sensibilité de mesure. Ces méthodes se concentrent en grande partie sur les processus affectant la surface de l'électrode de travail mais ne permettent pas de s'étendre au-delà des premières couches adsorbées. En effet, les techniques électrochimiques appliquées dans ces travaux sont sensibles sur quelques nanomètres contrairement à la méthode radiofréquence qui détecte l'apparition d'un biofilm à partir de plusieurs microns d'épaisseur. La nature des couches adsorbées pourraient également fortement dépendre des caractéristiques chimiques du milieu liquide (composition des milieux de culture, eau de mer, etc.). Il reste extrêmement délicat d'estimer ces effets sur les données récoltées et présentées dans le chapitre II, mais leur présence a au moins été mise en évidence et pourra faire l'objet de futures investigations dans le domaine des caractérisations radiofréquences de systèmes biologiques.

REFERENCES

- Abi Nassif, L., Rioual, S., Farah, W., Hellio, C., Fauchon, M., Trepos, R., Abboud, M., Diler, E., Thierry, D., Lescop, B., 2020. Reduction of potential ennoblement of stainless steel in natural seawater by an ecofriendly biopolymer. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 103609.
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., Schröder, U., 2015. Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2048–2055.
- Ben-Yoav, H., Freeman, A., Sternheim, M., Shacham-Diamand, Y., 2011. An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms. *Electrochimica Acta* 56, 7780–7786.
- Giorgi-Pérez, A.M., Arboleda-Ordoñez, A.M., Villamizar-Suárez, W., Cardeñosa-Mendoza, M., Jaimes-Prada, R., Rincón-Orozco, B., Niño-Gómez, M.E., 2021. Biofilm formation and its effects on microbiologically influenced corrosion of carbon steel in oilfield injection water via electrochemical techniques and scanning electron microscopy. *Bioelectrochemistry* 141, 107868.
- Jayaraman, A., Cheng, E.T., Earthman, J.C., Wood, T.K., 1997. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 11–17.
- Krishnaveni, P., Ganesh, V., 2021. Electron transfer studies of a conventional redox probe in human sweat and saliva bio-mimicking conditions. *Sci. Rep.* 11, 1–13.
- Liu, L., Xu, Y., Cui, F., Xia, Y., Chen, L., Mou, X., Lv, J., 2018. Monitoring of bacteria biofilms forming process by in-situ impedimetric biosensor chip. *Biosens. Bioelectron.* 112, 86–92.
- Loges, L.A., Silva, D.B., Paulino, G.V., Landell, M.F., Macedo, A.J., 2020. Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo. *Microb. Pathog.* 143, 104066.
- Maruthupandy, M., Anand, M., Maduraiveeran, G., Beevi, A.S.H., Priya, R.J., 2015. Electrical conductivity measurements of bacterial nanowires from *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 045007.
- Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M.C., Soriano, F., 2008b. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J. Appl. Microbiol.* 105, 585–590.
- Poma, N., Vivaldi, F., Bonini, A., Salvo, P., Kirchhain, A., Melai, B., Bottai, D., Tavanti, A., Di Francesco, F., 2020b. A graphenic and potentiometric sensor for monitoring the growth of bacterial biofilms. *Sens. Actuators B Chem.* 323, 128662.
- Wang, J., Lv, M., Du, M., Li, Z., Xu, T., Li, G., 2022. Effects of cathodic polarization on X65 steel inhibition behavior and mechanism of mixed microorganisms induced corrosion in seawater. *Corros. Sci.* 110670.
- Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranyake, L., Weerasekera, M., 2019. Influence of laboratory culture media on in vitro growth, adhesion, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med. Princ. Pract.* 28, 28–35.
- Zarabadi, M.P., Paquet-Mercier, F., Charette, S.J., Greener, J., 2017. Hydrodynamic effects on biofilms at the biointerface using a microfluidic electrochemical cell: case study of *Pseudomonas* sp. *Langmuir* 33, 2041–2049.
- Zhao, Y., Zhou, E., Liu, Y., Liao, S., Li, Z., Xu, D., Zhang, T., Gu, T., 2017. Comparison of different electrochemical techniques for continuous monitoring of the microbiologically influenced corrosion of 2205 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Corros. Sci.* 126, 142–151.

CHAPITRE IV

Application de la méthode hyperfréquence dans le domaine de la thérapie phagique

I.	INTRODUCTION	154
II.	MATERIEL ET METHODES	157
1.	CULTURES BACTERIENNES.....	157
2.	ISOLATION ET CULTURE DES BACTERIOPHAGES	157
3.	MESURE DE DENSITE OPTIQUE.....	158
4.	EXTRACTION ET DEGRADATION DES EPS	158
5.	CARACTERISATIONS MICROSCOPIQUES	160
5.1.	<i>Etude de dégradation du biofilm par microscopie confocale à balayage laser</i>	<i>160</i>
5.2.	<i>Caractérisation morphologique des virus</i>	<i>162</i>
6.	CARACTERISATION HYPERFREQUENCE.....	163
6.1.	<i>Préparation du capteur et des mesures</i>	<i>163</i>
6.2.	<i>Analyses statistiques</i>	<i>164</i>
III.	ETUDE DE LA DEGRADATION VIRALE D'UN BIOFILM.....	165
1.	LIMITES D'UN SUIVI CLASSIQUE DE DENSITE OPTIQUE	165
2.	ETUDE MICROSCOPIQUE DE LA PREDATION PHAGIQUE.....	166
2.1.	<i>Caractérisation du biofilm de la souche PAO1</i>	<i>166</i>
2.2.	<i>Observation d'un échantillon soumis à la prédation des phages.....</i>	<i>171</i>
IV.	APPLICATION DE LA METHODE HYPERFREQUENCE.....	173
1.	PROPRIETES DIELECTRIQUES DES BACTERIOPHAGES.....	173
2.	ETUDE DE L'EFFET BACTERICIDE DES PHAGES AVEC LE CAPTEUR RADIOFREQUENCE	174
2.1.	<i>Evaluation de la synergie virale</i>	<i>1669</i>
2.2.	<i>Relation prédateur/hôte.....</i>	<i>1710</i>
V.	CONCLUSIONS	180
	RÉFÉRENCES	181

I. INTRODUCTION

Les expériences réalisées avec le capteur radiofréquence présentées dans le chapitre II ont démontré sa capacité à détecter la formation d'un biofilm mono-espèce sur la sonde dans un système statique simple. L'utilisation des méthodes basses fréquences (suivi du potentiel en circuit ouvert ainsi que les études EIS) ont quant à elles mis en évidence la formation d'une couche d'adsorption des espèces ioniques présentes dans le milieu de culture TSB, non visible avec le capteur hyperfréquence. Cette couche combinée à la formation du biofilm induit une augmentation de la résistance à l'interface électrode/électrolyte tandis que la formation du biofilm sur la sonde coaxiale provoque une chute du coefficient de réflexion S_{11} signifiant une baisse de résistance. Ces deux études soulignent donc l'hétéroclisie des propriétés électriques mises en jeu lors de la formation d'un biofilm et l'importance d'observer le phénomène à plusieurs échelles.

Ayant acquis suffisamment de connaissances sur le fonctionnement du capteur RF, son utilisation dans un domaine spécifique peut être envisagée. Afin de maintenir des conditions de mesures proches des précédentes, l'application visée dans ce chapitre est l'étude de la dégradation d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* par l'action de bactériophages spécifiques de cette bactérie en conditions de laboratoire. La littérature scientifique dans le domaine de la thérapie phagique est en plein essor. Plusieurs scientifiques ont contribué au fil du temps au développement de ce qui est aujourd'hui appelé la phagothérapie. Découverts en 1896 dans le Gange et la Yamuna en Inde, des organismes très actifs contre *Vibrio cholerae* ont été mis en évidence par Ernest Hanbury Hankin, bactériologiste britannique. Félix d'Hérelle découvre la nature virale véritable des phages sur *Shigella dysenteriae* en 1917 (d'Hérelle, 1917) puis, en 1961, le microbiologiste britannique Frederick Twort publie un article décrivant un agent ou substance filtrable responsable de lyse bactérienne (Twort, 1961a). Les phages qui ciblent spécifiquement le genre *Pseudomonas* ont été découverts pour la première fois au milieu du vingtième siècle (Holloway *et al.*, 1960). En raison de la résistance élevée de ce micro-organisme aux antibiotiques, l'utilisation de bactériophages pour inhiber les croissances de *P. aeruginosa* a d'emblée représenté une stratégie de traitement alternative solide (Holloway *et al.*, 1960; Kellenberger & Kellenberger, 1957). Dans les années 1980, des études sont effectuées sur des animaux mais ce n'est qu'en 2016 que Paul Turner et ses collègues ont rapporté avoir isolé un phage capable de restaurer la sensibilité aux antibiotiques d'une souche de *P. aeruginosa* multirésistante (Chan *et al.*, 2016). L'utilisation de mélanges de bactériophages ayant des spectres d'hôtes différents dans une seule suspension, sous forme de cocktail de phages, est généralement plus efficace pour inhiber les infections bactériennes (Gu *et al.*, 2012; Jaiswal *et al.*, 2013). Les cocktails de bactériophages entraînent une meilleure réduction

de la densité bactérienne et améliorent l'efficacité des phages. Des études *in vitro* ont d'ailleurs démontré que les cocktails de bactériophages entraînent une réduction plus importante des infections à *P. aeruginosa* (Hall *et al.*, 2012). Les cocktails de phages peuvent facilement pénétrer dans le biofilm de *P. aeruginosa* et détruire sa structure en induisant la synthèse d'enzymes telles que la polysaccharidase (Hanlon, 2007). Cette enzyme synthétisée par le phage hydrolyse spécifiquement les polysaccharides excrétés par leur hôte. Elle aide le bactériophage à s'adsorber, envahir et désintégrer les colonies de bactéries hôtes (Azeredo *et al.*, 2018). De plus, les bactériophages synthétisent des enzymes hydrolases du peptidoglycane, appelées endolysines ou lysines, à la fin du cycle lytique. Ces enzymes décomposent le peptidoglycane de l'intérieur et contribuent à la libération de nouvelles progénies virales hors de la cellule (Oliveira *et al.*, 2018). Les endolysines sont toujours proposées comme agents antibactériens en raison de leur activité spécifique élevée et de leur mode d'action unique contre les bactéries. L'activité des endolysines est d'ailleurs indépendante des profils de sensibilité aux antibiotiques (Ciofu *et al.*, 2022; Love *et al.*, 2018).

Il convient de noter que les bactériophages présentent des avantages par rapport aux antibiotiques pour inhiber les infections causées par des biofilms bactériens. Les bactériophages pénètrent la couche interne du biofilm, contrairement aux antibiotiques qui sont fortement bloqués par la matrice du biofilm. En outre, les bactériophages sont capables d'infecter les cellules persistantes et de les détruire si elles sont réactivées après un stade sporulant. Un autre mécanisme d'inhibition du biofilm par les bactériophages est la production d'enzymes qui inhibent la production de biofilm. Une étude a rapporté que les bactériophages modifiés génétiquement peuvent induire la synthèse de lactonases activatrices du quorum quenching, qui inhibent la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* de par l'activité du quorum sensing (QS) (Geredew Kifelew *et al.*, 2019). Par conséquent, compte tenu du rôle déterminant du biofilm de *P. aeruginosa* dans le développement de la résistance aux antibiotiques et des infections chroniques, il est essentiel de trouver de nouvelles stratégies pour l'inhiber, et l'utilisation de phages est une des applications innovantes de ce domaine. Des méthodes de détection et de quantification des bactériophages ont été conçues depuis leur découverte en 1917 (d'Herelle, 1917). Ces méthodes, basées sur la présence de plages de lyse dans les communautés de bactéries hôtes se développant dans une double couche de gélose, ont été décrites en détail par Mark Adams en 1959 et elles ont constitué jusqu'à présent la méthode préliminaire de choix pour la détection des virus. Malgré la robustesse de la méthode, les longs délais nécessaires à la détection (24 à 48 heures), la nature laborieuse de la méthodologie et la difficulté de la convertir en un format automatisé ou semi-automatisé pour les tests à haut débit, rendent cette méthode classique mal adaptée pour

répondre aux défis des applications cliniques, environnementales ou industrielles actuelles. Dans le domaine clinique par exemple, la nécessité d'évaluer l'interférence des phages dans les outils de diagnostic microbiologique, qu'il s'agisse de la détection des agents pathogènes ou de l'antibiogramme (Brown-Jaque *et al.*, 2016), et le besoin croissant de surveiller les technologies émergentes de thérapie par les phages (Cairns *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2018) exigent le développement de méthodes fiables et rapides pour la détection des phages et de leur mode d'action par-delà le classique phagogramme. De plus, la disponibilité de méthodes évaluant l'efficacité d'un traitement bactériophagique dans l'environnement industriel fait cruellement défaut depuis de nombreuses années. La surveillance des phages responsables de l'échec de processus industriels basés sur des microbes, tels que la production de produits laitiers (Garneau & Moineau, 2011; Li *et al.*, 2015), ainsi que l'utilisation des phages dans le biocontrôle des bactéries pathogènes alimentaires ou comme aide à l'éradication des biofilms (Harada *et al.*, 2018), nécessitent toutes des méthodes rapides, peu coûteuses et sensibles pour les applications de surveillance de routine. L'intérêt croissant pour la surveillance des phages dans ces domaines a suscité le développement d'une nouvelle génération de méthodes agiles et sensibles, capables de surmonter les limitations dérivées du plaquage sur double couche de gélose. Ces méthodes sont basées sur deux techniques :

- la détection directe des particules virales par PCR (del Rio *et al.*, 2007), qPCR (Ly-Chatain *et al.*, 2011), spectroscopie Raman (Tayyarcin *et al.*, 2018), immuno-essai (Khan *et al.*, 2015), spectrométrie de masse (Clément, 2021)
- la lyse de l'organisme hôte par cytométrie de flux (Michelsen *et al.*, 2007), microscopie à épifluorescence (Wang and Nitin, 2014), libération d'enzymes (Stanek and Falkinham III, 2001) ou mesures d'impédance (Gula *et al.*, 2020).

Aussi sophistiquées soient-elles, nombres de ces méthodes n'atteignent pas de grandes sensibilités, ni de bonne rapidité d'analyse et manquent de spécificité. De plus, ces méthodes sont, d'une manière générale, trop éloignées des besoins et de la réalité du monde industriel. La complexité et le coût de l'instrumentation nécessaire à l'analyse constituent également un obstacle définitif à leur mise en œuvre systématique dans de nombreux environnements. Dans cette optique, les travaux de ce chapitre de thèse visent à étudier le potentiel d'utilisation du capteur radiofréquence développé comme une méthode simple pour l'étude en temps réel d'une thérapie phagique contre la croissance et la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Une discussion s'articulera autour des performances du capteur radiofréquence dans ce domaine afin d'identifier les avantages et les limites de cette méthode pour une application concrète à l'échelle industrielle.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Cultures bactériennes

La souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* a été utilisée pour les expériences de ce chapitre. Ce protocole a été développé par la société Leo viridis. Initialement congelée à -80°C dans un milieu glycérol (10%), la souche est inoculée sur du milieu M1 gélosé (Tryptone - 10 g/l ; Extrait de viande - 5g/l ; Chlorure de sodium - 5g/l) puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Après vérification de la pureté des colonies formées, l'une d'entre elles est inoculée dans du milieu M1 liquide et à nouveau incubée à 37°C sous agitation (120 rpm) pendant une nuit. La culture obtenue est ensuite utilisée pour les différents essais.

2. Isolement et culture des bactériophages

L'isolement des bactériophages est réalisé en utilisant la technique des plages de lyse. Le but est d'isoler les souches virales présentant un cycle lytique. Les bactériophages Domino-17 (*PseuDOMonas aeruginosa* PaO1 virus 17) sont récoltés à partir d'eaux usées par la société Leo viridis. Le test de lyse bactérienne a été réalisé en introduisant *P. aeruginosa* dans du milieu M1 gélosé, suivant le protocole de Lelchat *et al.*, (2019). Lorsque le milieu est suffisamment solidifié, 5 µl de suspension virale sont déposés au centre de la plaque d'essai. L'ensemble est incubé à 37°C. Après 24 heures d'incubation, l'apparition d'une plage de lyse (figure 56) révèle la présence d'un bactériophage lytique (Domino-17). Le halo, visible au centre de la plaque, signifie que les virus dépolymérisent la matrice du biofilm bactérien et détruisent les cellules. Une incubation plus longue provoquera un élargissement de ce halo. Afin de produire le virus en grande quantité, une plage de lyse est extraite puis resuspendue dans du milieu M1 en présence de l'hôte, et incubée à 30°C sous agitation (50 rpm) pendant au moins une nuitée.

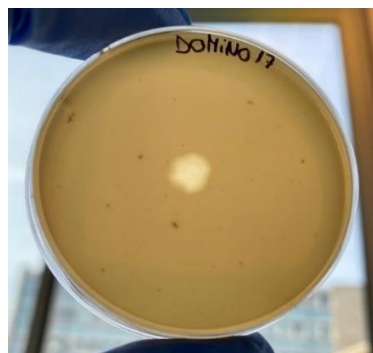


Figure 56 : Plage de lyse des bactériophages sur une culture de *P. aeruginosa*.

3. Mesure de densité optique

Le suivi de croissance par mesure de DO_{600} a été réalisé par lecture automatique de la densité optique des suspensions bactériennes toutes les dix minutes pendant 30 heures par un spectrophotomètre TECAN Infinite™ issu du protocole décrit dans les travaux de *Lelchat et al.*, (2015). Les mesures ont été réalisées dans une plaque en polystyrène de 6 puits, représentant chacun un réplica. Chaque puits contenant un inoculum bactérien a été incubé à 37°C puis les virions ont été injectés en solution après les 6 premières heures d'incubation.

4. Extraction et dégradation des EPS

Le protocole utilisé est tiré des travaux de *Lelchat et al.* (2015, 2019). La production d'EPS en gros volume se fait progressivement, selon le schéma de la figure 57. Premièrement, deux précultures de la souche PAO1 dans du milieu M1 sont réalisées dans des volumes de 10 ml puis 200 ml. La préculture de 200 ml est ensuite inoculée dans 2,5 litres de milieu M1 incubée pendant au moins 72 heures à 37°C sous forte agitation (200 rpm) afin de permettre une bonne oxygénation.

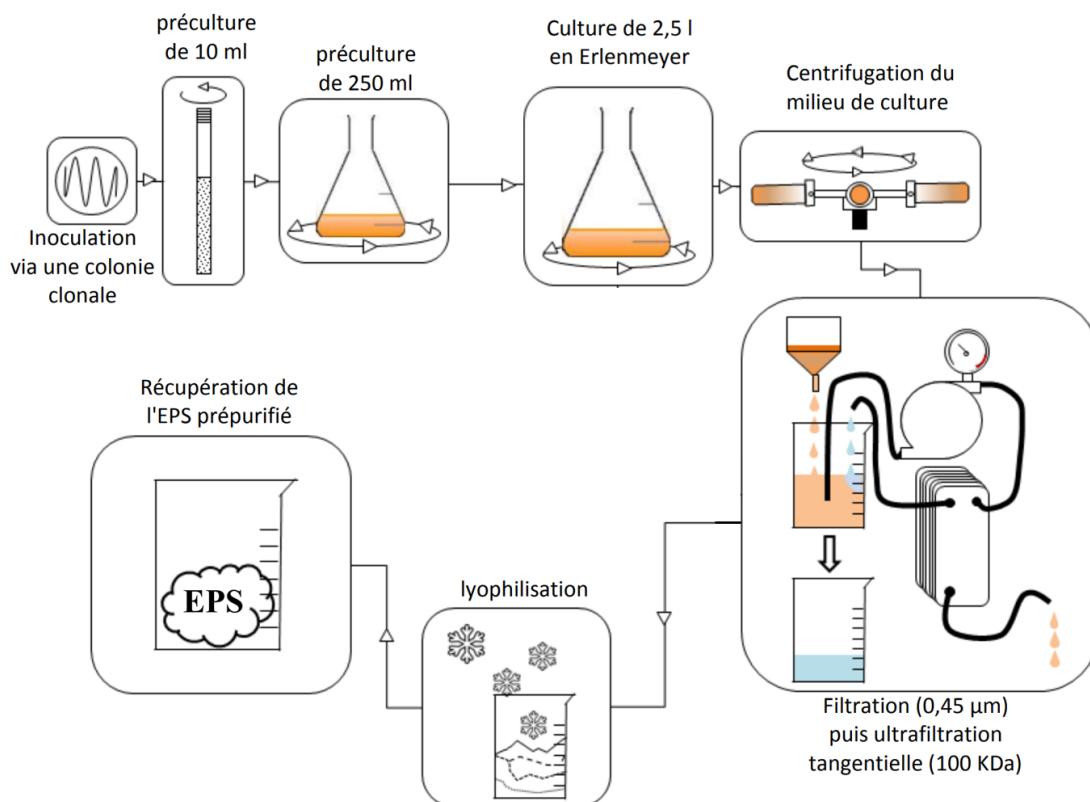


Figure 57 : Production et purification d'un EPS bactérien par fermentation.

La croissance bactérienne est contrôlée par mesure de DO_{600} . A la fin de l'incubation, les bactéries sont séparées par centrifugation (45 minutes, 14 000 rpm, 4°C). Le surnageant est récupéré, filtré par Büchner à 0,45 μm sur un filtre en fibre de verre (Whatman®) puis 0,4 gramme d'azoture de sodium (NaN_3) par litre de liquide est ajouté afin de prévenir toute contamination bactérienne. L'EPS produit est partiellement purifié par filtration tangentielle sur une cassette de 100 KDa en PES (Millipore®) contre de l'eau distillée. Une fois la conductivité du perméat proche de 20 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, le rétentat est congelé à -20°C et lyophilisé. L'EPS sec est enfin pesé puis stocké à l'abri de la lumière et de l'humidité.

L'étude d'activité enzymatique virale est réalisée en triplicat dans du milieu M1 à partir de solution d'EPS à 0,2% (m/v) à laquelle une suspension virale est ajoutée. De l'azoture de sodium est systématiquement ajouté comme bactériostatique à une concentration de 6 mM. Toutes les incubations sont préparées sur de la glace afin de prévenir toute dégradation enzymatique précoce. Les échantillons sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C durant 24 heures sous agitation (120 rpm). Le lendemain, les échantillons sont placés 5 minutes à 100°C pour stopper toute activité enzymatique. Des contrôles avec bactériophages seuls et EPS seul suivent la même procédure.

La visualisation des résultats s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose. Les échantillons sont centrifugés (10 minutes, 10 000 rpm, 4°C) puis déposés sur un gel d'agarose 1% (1 g d'agarose avec 100 ml de milieu M1). 12 μl d'échantillon sont déposés dans chaque puits d'électrophorèse. La migration s'effectue à une tension de 100 V pendant 75 minutes. Le gel est ensuite coloré pendant une nuit à l'obscurité dans un bain de STAINS ALL (10 ml de 3,3'-diéthyl-9-méthyl-4,5,4',5'-debenzothiocarbocyanide à 0,1% dans du *N,N*-diméthylformamide, 10 ml de *N,N*-diméthylformamide, 50 ml d'isopropanol et 10 ml de Tris HCl 300 mM). Le gel est lavé dans un bain d'eau distillée puis décoloré pendant environ 2 heures à la lumière blanche. Les fractions polysaccharidiques apparaissent en bleu et les fractions protéiques en rose-rouge. La comparaison des profils de migration entre le temps initial et le temps final renseigne sur le succès de la dépolymérisation.

5. Caractérisations microscopiques

5.1. Etude de dégradation du biofilm par microscopie confocale à balayage laser

Deux groupes d'échantillons ont été préparés afin de réaliser les observations au microscope confocal à balayage laser, comme schématisé dans la figure 58. Chaque échantillon a été préparé dans des μ Dish© à fond en verre de la marque Ibidi®. Le premier groupe témoin ne contient aucun virion. Il est composé de cinq échantillons dont un contrôle (contient 3 ml milieu de culture M1), un témoin (contient 3 ml de culture M1 et 7,5 μ l de suspension bactérienne de la souche PAO1) ainsi que 3 échantillons destinés à l'observation microscopique (composition identique au témoin). Le second groupe est composé d'un contrôle (3 ml de milieu M1), un témoin (3 ml de milieu M1 et 7,5 μ l de culture bactérienne) ainsi que 3 échantillons identiques au témoin auxquels une charge virale (MOI = 10) sera ajoutée après 4h d'incubation à 37°C avec une agitation orbitale configurée à 50 rpm. Ils seront ensuite à nouveau incubés pendant 20h après l'ajout des bactériophages. Le premier groupe exempt de virion a été directement incubé pendant 24 heures dans les mêmes conditions. Lorsque les contrôles n'indiquent aucune contamination, tous les échantillons ont été traités avec 1,2 ml de formaldéhyde 70% v/v pendant 30 minutes afin de fixer le biofilm. Le surplus de liquide a ensuite été retiré à l'aide d'une pipette par aspiration sur les bords des μ Dish©.

Le marquage des cellules bactériennes a été réalisé en ajoutant 2 μ l de Syto9 au centre des μ Dish©. Les échantillons sont observés avec le microscope confocal à balayage laser de la plateforme Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie de l'Université de Bretagne Occidentale. Les paramètres d'observation ont été réglés sur une fréquence d'excitation de 455 nm et d'émission de 505 nm. Chacun des trois échantillons des deux groupes a été observé sur cinq zones différentes. Les meilleurs clichés ont été sélectionnés pour illustrer ce manuscrit et sont représentatifs de l'ensemble de l'échantillon observé. Les reconstitutions en trois dimensions sont obtenues à partir de la superposition de plusieurs plans focaux en deux dimensions. Les images en trois dimensions représentent une section d'échantillon de volume égal à 0,0035 mm³. Les coupes orthogonales sur les axes x et y ont été effectuées afin d'étudier l'homogénéité de l'épaisseur du biofilm sur ces mêmes axes. Les agrandissements présentés ont été obtenus en réalisant de nouvelles mesures sur une zone plus restreinte.

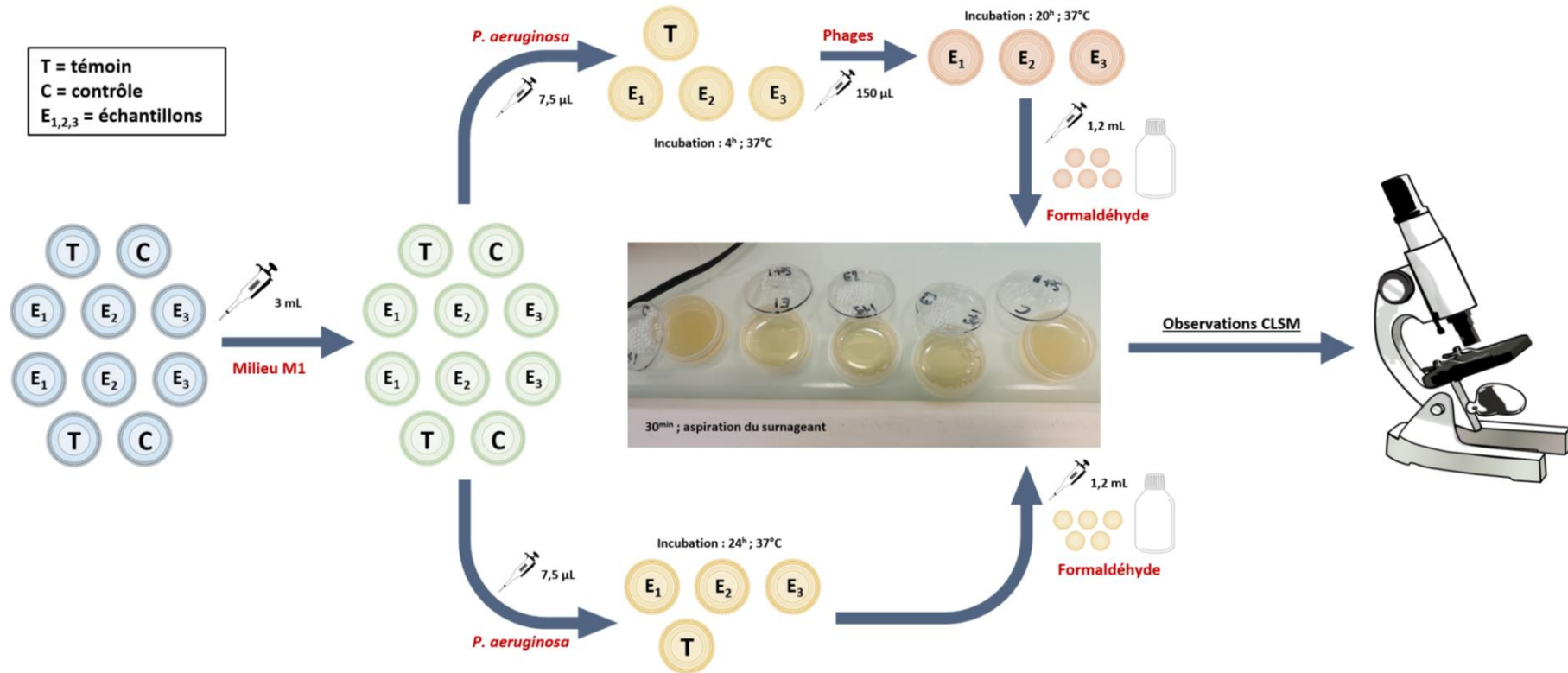


Figure 58 : Schématisation de la méthodologie employée pour la préparation des échantillons afin d'observer la dégradation d'un biofilm par les bactériophages.

5.2. Caractérisation morphologique des virus

La classification des virus est essentiellement basée sur leurs caractéristiques morphologiques (forme de la capsid, taille et forme de la queue) en microscopie électronique à transmission (MET) après coloration négative à l'acétate d'uranyle. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et peu onéreuse tout en permettant d'obtenir des données biométriques à partir des images des virus. Pour cela, 10 μl d'une suspension de phages sont déposés pendant trois minutes sur la face opaque d'une grille en cuivre revêtue de carbone (Electron Microscopy Science®). L'excès de solution est éliminé avec du papier Whatman® et une goutte d'acétate d'uranyle (2% m/v en eau ultrapure, filtré à 0,2 μm) est déposée sur la grille pendant 30 secondes. L'excès est éliminé avec du papier Whatman®. Une fois la grille sèche, les virus adsorbés sont observés au MET sous un voltage de 100 kV (JEOL JEM 1400®) à la Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie. Les images acquises sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ® afin de mesurer la taille des têtes, queues et appendices des bactériophages. Une sélection d'images obtenues est présentée dans la figure 59. Les bactériophages présents correspondent bien à ceux cultivés initialement et attestent de la pureté de la culture virale.

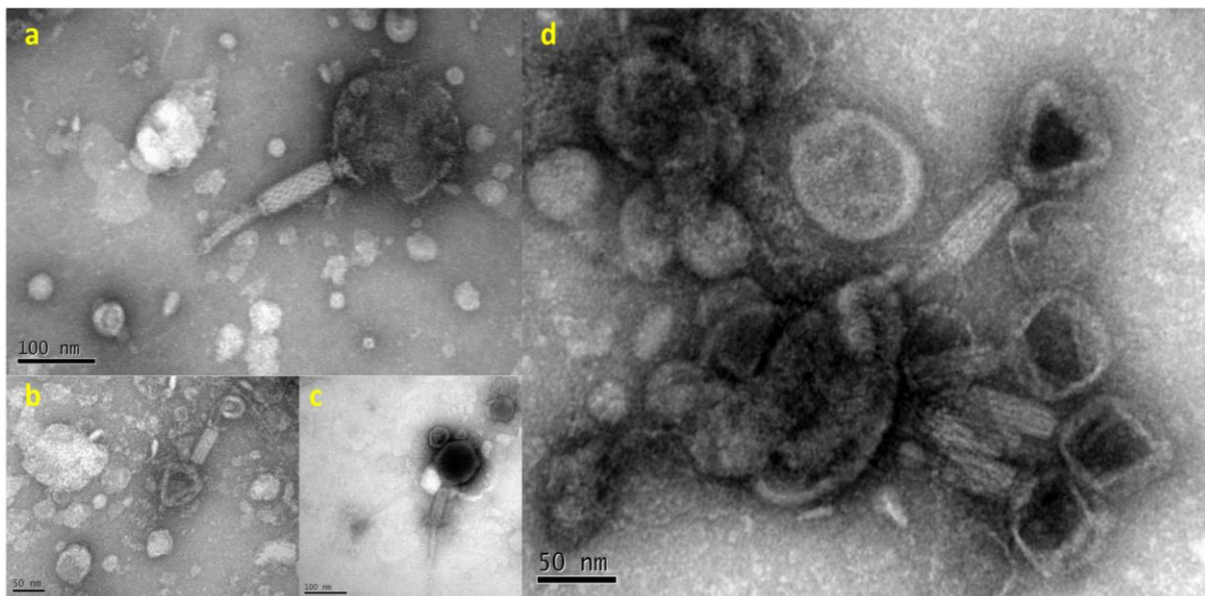


Figure 59 : Images du phage Domino-17 (*Myoviridae*) au microscope électronique à transmission.

6. Caractérisation hyperfréquence

6.1. Préparation du capteur et des mesures

Afin d'étudier les propriétés diélectriques des solutions biologiques et de réaliser des cinétiques de croissance, le capteur radiofréquence présenté dans le chapitre II de ce manuscrit a été utilisé. Le modèle en acier inoxydable (figure 60a) a été sélectionné en raison de la nécessité de maintenir une protection optimale contre les contaminations lors des étapes d'ajout des bactériophages. Afin d'évaluer l'impact des bactériophages sur la réponse du capteur, quatre mesures ont été réalisées sur la gamme de fréquence 100 MHz - 3 GHz. La première a été réalisée dans l'air (vérification de la calibration du système expérimental), la seconde dans 10 ml de milieu de culture M1 stérile et les suivantes après l'ajout de 1 ml de suspension virale (dès l'ajout puis après une heure d'attente) afin de mettre en évidence un potentiel conditionnement de la sonde par les virus.

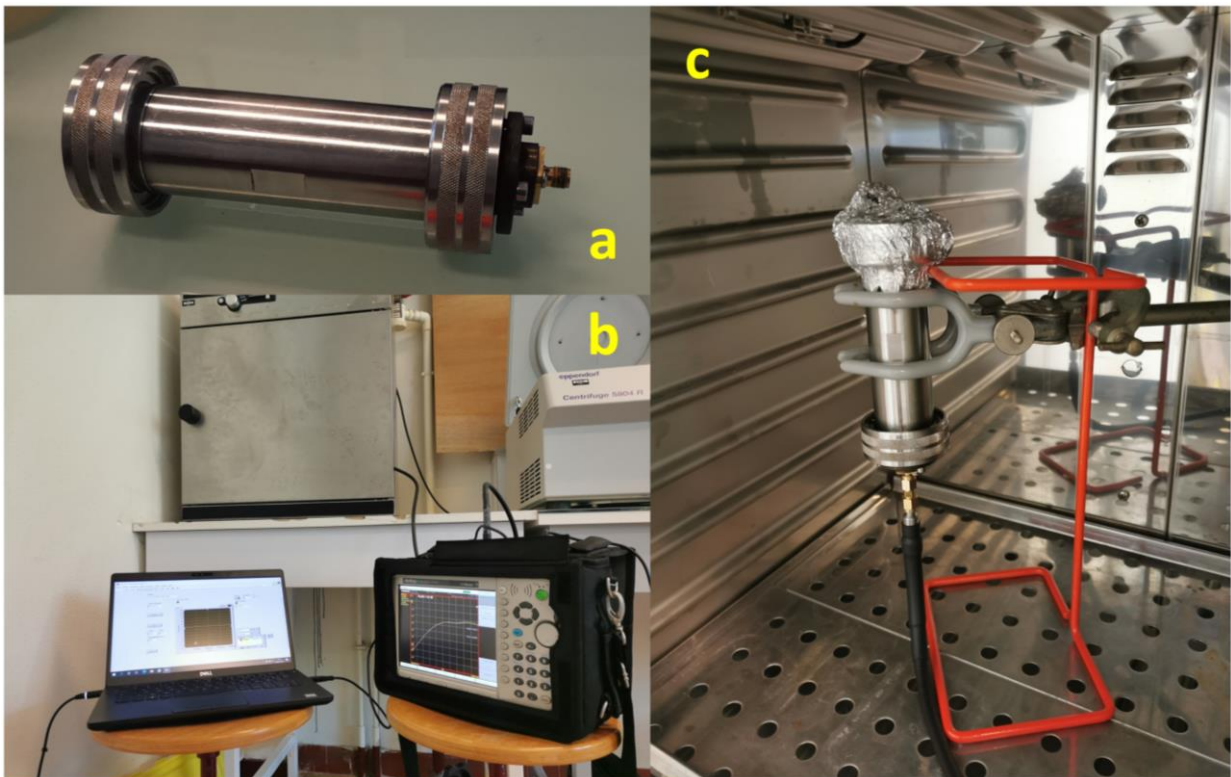


Figure 60 : Photographies du dispositif expérimental utilisé pour la caractérisation hyperfréquence des échantillons contaminés par les bactériophages. a – Capteur en acier inoxydable ; b – Analyseur de réseau vectoriel et programme d'automatisation LabView reliés à l'étuve contenant le capteur ; c – Capteur maintenu à la verticale à l'intérieur de l'étuve.

Les cinétiques de croissance se sont déroulées sur un minimum de 40 heures afin de permettre aux bactéries de coloniser toutes les surfaces. Les mesures ont été effectuées toutes les 30 minutes sur la gamme de fréquence 100 MHz – 3 GHz trois fois à l'aide d'un programme LabView® relié au VNA (figure 60b). 20 ml de milieu de culture M1 stérile ont été ajoutés dans le réservoir en acier inoxydable du capteur (préalablement stérilisé par autoclave, 121°C pendant 30 minutes). Chaque cinétique de croissance a débuté au moment de l'inoculation du système par la souche PAO1 en ajoutant 50 µl de suspension bactérienne dans le réservoir. Le capteur est ensuite fermé à l'aide de son couvercle et recouvert par de l'aluminium. L'ensemble a ensuite été placé dans une étuve thermostatée à 37°C, sans agitation (figure 60c). Au bout de 4 heures, entre deux mesures automatiques, le capteur est rapidement retiré pour ajouter 1 ml de suspension virale (MOI = 10), contenant le bactériophage Domino-17, ou un cocktail de phages Domino-2, 3, 4, 5, 8, 9 et 11.

6.2. Analyses statistiques

Toutes les courbes réalisées à partir du capteur radiofréquence représentent une moyenne de cinq mesures successives. L'activité virale très variable au sein du système ne permet pas d'étudier la reproductibilité de l'étude. La signification des différences a été déterminée au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA). Ces analyses ont été programmées et automatisées sur le logiciel R© (version 3.6.1). Le seuil de valeur $P < 0,05$ a été sélectionné afin de déterminer la signification des différences observées. Tous les tests réalisés indiquent qu'aucune différence statistique n'est présente entre les 5 réplicas successifs de chaque mesure.

III. ETUDE DE LA DEGRADATION VIRALE D'UN BIOFILM

1. Limites d'un suivi classique de densité optique

Une méthode couramment employée dans la littérature scientifique pour suivre l'inhibition bactérienne par thérapie phagique d'un milieu liquide est la mesure de densité optique. Cette méthode permet de mesurer l'opacité d'une solution qui sera proportionnelle à la quantité de matière en suspension ou dissoute. Nos résultats de suivi de croissance sont présentés dans la figure 61.

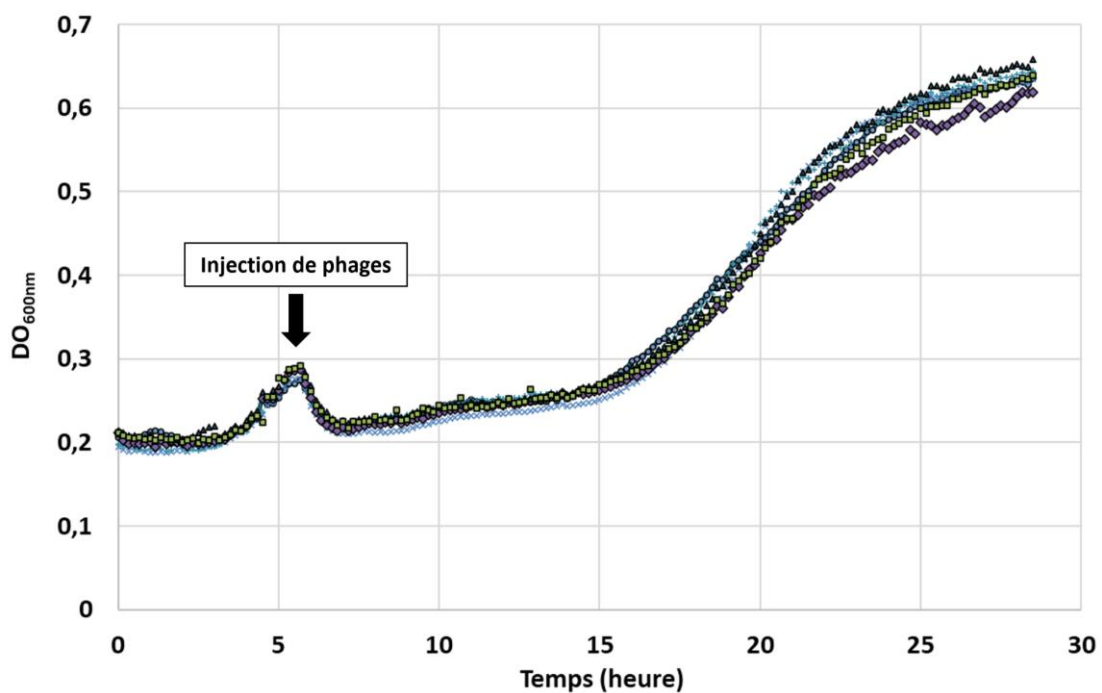


Figure 61 : Cinétique de croissance de *P. aeruginosa* suite à l'injection de phages 6 heures après le départ des mesures.

Les six réplicas montrent une phase de latence sur les quatre premières heures de suivi au-delà de laquelle la limite de détection de la méthode est franchie. Ensuite, la densité optique augmente de 0,2 à 0,3 en deux heures indiquant une croissance de la densité cellulaire. Suite à l'injection des bactériophages (6h d'incubation), la densité optique chute brusquement puis repart à la hausse après quelques heures d'incubation supplémentaires et se stabilise à partir d'une journée de croissance. L'interprétation de ces résultats peut être délicate. Les bactériophages sont des micro-organismes capables de troubler la mesure si les débris cellulaires générés par la lyse virale sédimentent et s'adsorbent au fond des puits. De plus, il n'est pas exclu que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* forme un biofilm sur les parois des puits. La matrice extracellulaire peut également absorber une fraction du faisceau lumineux incident et ainsi apporter une contribution

non négligeable à la valeur de densité optique relevée. Tous ces éléments combinés biaisent potentiellement le suivi de croissance bactérien. Cependant, la chute provoquée par l'ajout des virus ne peut être remise en cause, car la lyse cellulaire diminue la teneur en particules suspendues dans le milieu de culture. La forte hausse du signal au-delà de 10 heures d'incubation correspond très probablement à la sélection et au développement de bactéries résistantes aux phages injectés ce qui a pour conséquence l'augmentation de la densité optique du milieu. Cependant, la mesure de DO ne permet pas de discerner si ce développement est lié à une croissance en biofilm ou sous forme planctonique, ce qui, dans le cas d'une pathologie bactérienne, aura une très forte incidence sur l'évolution du diagnostic. Cette analyse met en avant les limites du suivi classique par densité optique. Simple à mettre en place et automatisable, cette méthode devient rapidement difficile à exploiter lorsque plusieurs micro-organismes et phénomènes biologiques évoluent simultanément.

2. Etude microscopique de la prédation phagique

2.1. Caractérisation du biofilm de la souche PAO1

Les criblages biologiques réalisés par la société Leo viridis attestent de l'efficacité des bactériophages pour réguler la croissance bactérienne et, potentiellement, le développement d'un biofilm. Mais il reste difficile d'estimer le réel impact des phages sur les processus de croissance de *P. aeruginosa* sans observer directement le comportement des bactéries dans leur environnement tridimensionnel. La microscopie confocale rend possible la réalisation d'un schéma en trois dimensions de l'architecture du biofilm et l'observation de l'impact des bactériophages sur sa formation. L'étude suivante vise à comparer deux conditions de croissance de la bactérie *P. aeruginosa*, l'une en condition de croissance classique et l'autre soumise à la prédation du bactériophage Domino-17. La figure 62 est une observation au microscope confocal d'une section du biofilm d'un échantillon témoin afin d'évaluer l'épaisseur du film bactérien. Le biofilm produit par la souche PAO1, après une journée de développement, est rugueux et recouvre la quasi-totalité des surfaces immergées. Sur cette zone, l'épaisseur du film bactérien est comprise entre 10 et 20 μm d'après la visualisation 3D. La coupe orthogonale permet d'obtenir une estimation plus précise. Au niveau de la zone creuse à proximité du curseur, l'épaisseur du biofilm mesure 18 μm . Cependant, cette caractéristique n'est pas constante sur la zone observée. Le biofilm est plus épais sur la tranche droite de la coupe orthogonale que sur le bord opposé soulignant le développement hétérogène de ce dernier. En prenant en compte l'entièreté de la section observée, l'épaisseur du biofilm fluctue entre 13 et 27 μm . Ce gradient d'épaisseur

pourrait être expliqué par la production spécifique de certains EPS au sein de la matrice. D'après de récentes études, au moins trois exopolysaccharides nommés Psl, Pel et certains alginates, peuvent contribuer à la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* (Passos da Silva *et al.*, 2017; Valentine *et al.*, 2020; Whitfield & Howell, 2021).

D'après les travaux d'Irie *et al.* (2017) le Psl s'associe principalement aux cellules de surface lors de la formation des biofilms précoces de *Pseudomonas aeruginosa*. Il relie les bactéries, intriquant chaque cellule dans une matrice complexe. En poursuivant le développement, de multiples couches d'agrégats cellulaires se forment et le Psl couvre toute la structure. Lorsqu'un biofilm évolue vers une microcolonie tridimensionnelle, le Psl se localise à la périphérie plutôt qu'au centre. Au cours de cette maturation, une cavité matricielle se forme ce qui prépare le biofilm aux futurs événements de dispersion. Suite à cette dispersion, la cavité vide reste discernable par l'absence de fluorescence (Irie *et al.*, 2017). L'échantillon observé dans la figure 62 pourrait contenir une plus grande quantité de microcolonies matures sur la zone plus épaisse, dont la quantité de matrice extracellulaire serait importante. Le développement des biofilms de *P. aeruginosa* nécessite une coordination à l'échelle de la population des cellules individuelles au sein de la même communauté bactérienne (Yan & Wu, 2019). *P. aeruginosa* utilise de multiples voies de transduction de signaux interconnectées, connues sous le nom de quorum sensing dont les mécanismes principaux ont été revus dans le premier chapitre de ce manuscrit. Ce mode de communication intraspécifique intercellulaire complexe permet, en fin de compte, d'orchestrer un comportement collectif essentiel à l'adaptation et à la survie de communautés entières. *P. aeruginosa* enclenche le QS en réponse à des changements de la densité cellulaire lors de son développement en conditions idéales (Mukherjee and Bassler, 2019). La production, la sécrétion et l'accumulation des autoinducteurs entraînent la sécrétion des différents exopolysaccharides en fonction des stades de croissance du biofilm à l'échelle de la population entière. Les différences d'épaisseur du biofilm observées dans la figure 62 peuvent correspondre à des zones où les stades de développement du film bactérien sont différents. La densité cellulaire peut avoir été plus importante sur certaines zones où les premières colonies se sont formées, déclenchant le processus du QS précocement et augmentant la production du biofilm localement. Suite à ces observations, une seconde zone a été scannée avec des paramètres d'acquisitions prenant en compte plus de plans focaux et un temps d'acquisition par plan plus long afin d'obtenir une meilleure résolution sur une zone comportant un relief particulièrement prononcé. La figure 63 représente la reconstitution obtenue. Une rugosité plus marquée que sur l'échantillon précédent est visible. La structure en trois dimensions de la zone étudiée, dans la figure 63a, indique une épaisseur du film plus conséquente, vraisemblablement proche des 40 μm .

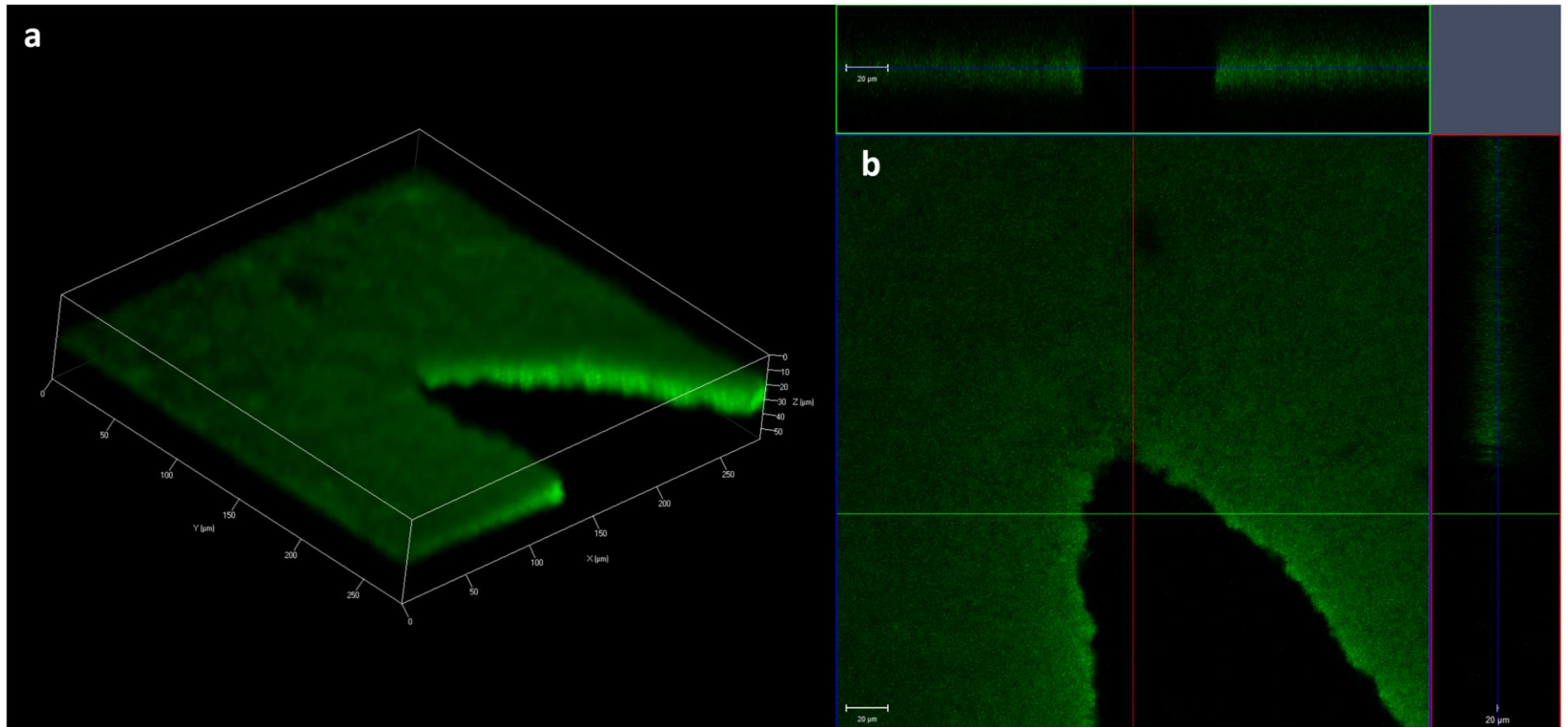


Figure 62 : Biofilm de *P. aeruginosa* observé au microscope confocal après 24 heures de croissance en l'absence de bactériophages (échantillon n°1). a – reconstitution en trois dimensions du biofilm ; b – coupes orthogonales.

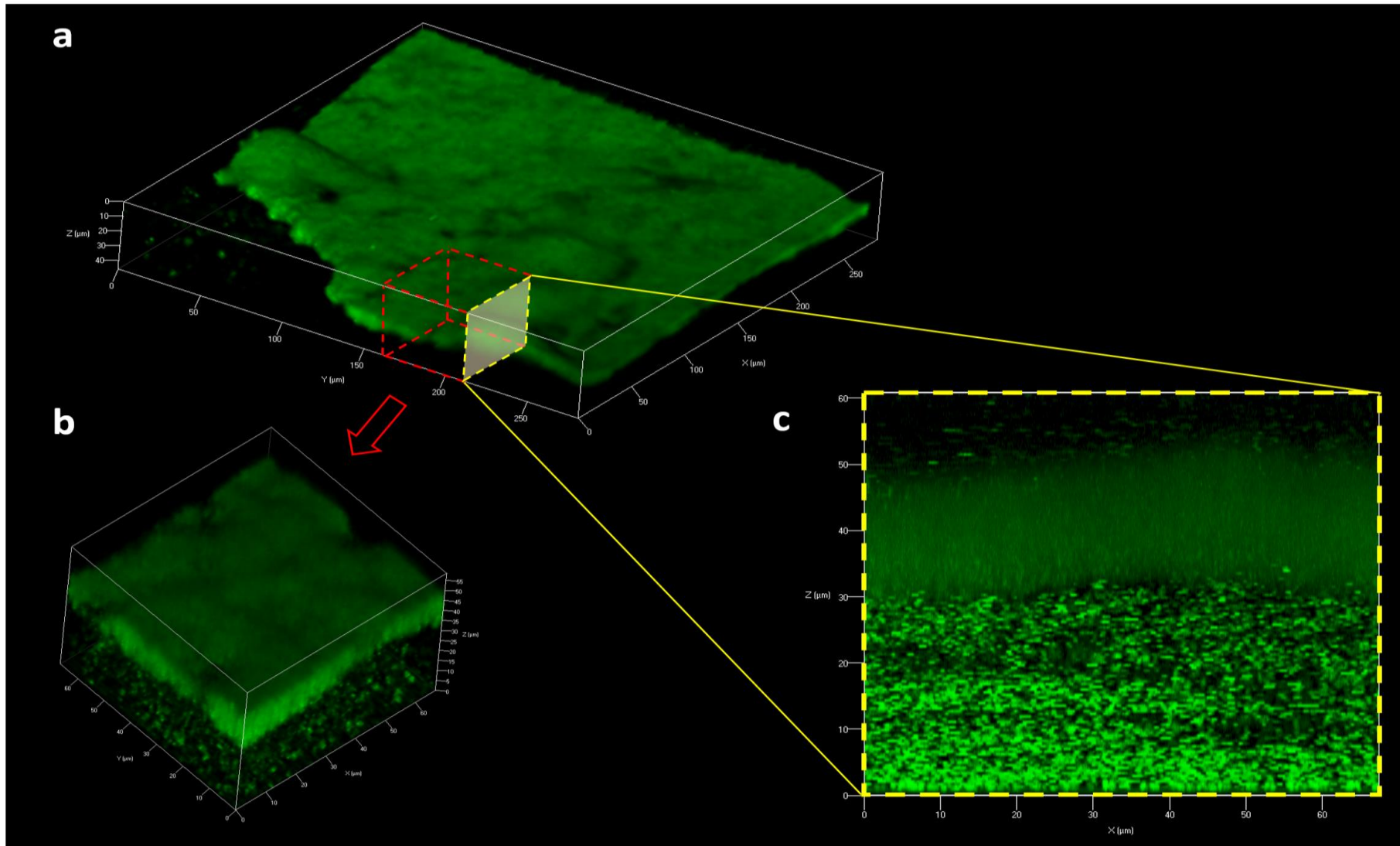


Figure 63 : Biofilm de *P. aeruginosa* observé au microscope confocal après 24 heures de croissance en l'absence de bactériophages (échantillon n°2). Observation d'une zone de relief important. a – reconstitution en trois dimensions du biofilm ; b – réalisation d'une seconde reconstitution d'une section de l'image a avec un grossissement plus important ; c – visualisation en deux dimensions d'une face de l'image b.

Dans la figure 63b, un cube de volume égal à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ a été extrait, équivalent à un grossissement par 16 de la figure originelle. Cette approche permet de mettre en évidence qu'une partie de l'épaisseur du film est dépourvue de matrice polysaccharidique. Une fine couche de liquide semble en réalité se loger sous le biofilm à certains endroits ce qui a pour conséquence d'accentuer la rugosité du biofilm bactérien. Ce phénomène, absent sur la section de la figure 62, est d'autant plus marqué sur la coupe verticale d'une face de la figure 63b et représentée dans la figure 63c. La forte densité cellulaire sous le biofilm bactérien indique qu'il s'agit probablement d'une migration des cellules bactériennes vers les couches profondes de ce dernier.

La revue bibliographique de Reichhardt et Parsek en 2019 sur l'utilisation de méthodes d'observations microscopiques de la répartition des cellules de la bactérie *P. aeruginosa* au sein du biofilm (Reichhardt & Parsek, 2019a) a révélé que la localisation de certains exopolysaccharides varie au cours du développement du biofilm. Les études de Ma *et al.* se sont notamment focalisées sur le Psl, un des EPS engagés tout au long du processus de formation du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 (Ma *et al.*, 2009, 2007). D'après ces études, ce biopolymère est associé aux premiers agrégats formés et il joue un rôle dans les interactions intercellulaires ainsi que l'assemblage de la matrice des biofilms précoces. Dans le cas d'un biofilm mature, ces recherches ont prouvé que le Psl s'accumule à la périphérie du film et n'a pas été observé dans la cavité intérieure des agrégats. Ces conclusions corroborent parfaitement les observations réalisées et peuvent partiellement expliquer pourquoi la densité cellulaire est très faible sur les premières couches du biofilm.

Prenant en compte ces observations, l'épaisseur du biofilm de *P. aeruginosa* est compris entre 50 et 80 μm dont une partie (environ les 20 premiers microns) est composée quasiment exclusivement de polysaccharides ou, au moins, d'un mélange de substances exopolymériques. La grande majorité des particules virales des phages a une taille comprise entre 25 et 300 nm (Lelchat, 2020). Il est donc primordial pour les bactériophages d'avoir les enzymes nécessaires pour dégrader cette pré-couche polysaccharidique, qui peut facilement représenter 1000 fois ou plus la taille des phages, afin de pouvoir s'adsorber sur leurs hôtes et d'injecter leur matériel génétique au sein des cellules bactériennes pour enclencher leur cycle de réplication.

2.2. Observation d'un échantillon soumis à la prédation des phages

La figure 64 représente une observation d'un échantillon soumis à la prédation d'une souche de bactériophages (Domino-17). Les virus ont été injectés après 4 heures de croissance bactérienne et la fixation du biofilm pour l'observation microscopique a été effectuée au bout de 24 heures de culture en condition statique. Sur la reconstitution en trois dimensions de la figure 64a, le film bactérien est extrêmement fin. A l'inverse des échantillons témoins, il semble n'y avoir dans ce cas qu'une monocouche bactérienne tapissant la surface. Deux agrégats isolés sont visibles. L'un d'entre eux se situe en surface, partiellement visible contre la face supérieure de la figure 64a. Le second, accolé sur la surface en verre, a été observé sur un plan en deux dimensions représenté par la figure 64b. Dans cette configuration, il est possible de distinguer quelques bactéries évoluant autour de cet agrégat. La surface en verre semble avoir été modifiée, laissant apparaître des zones circulaires dépourvues de molécules chromophores.

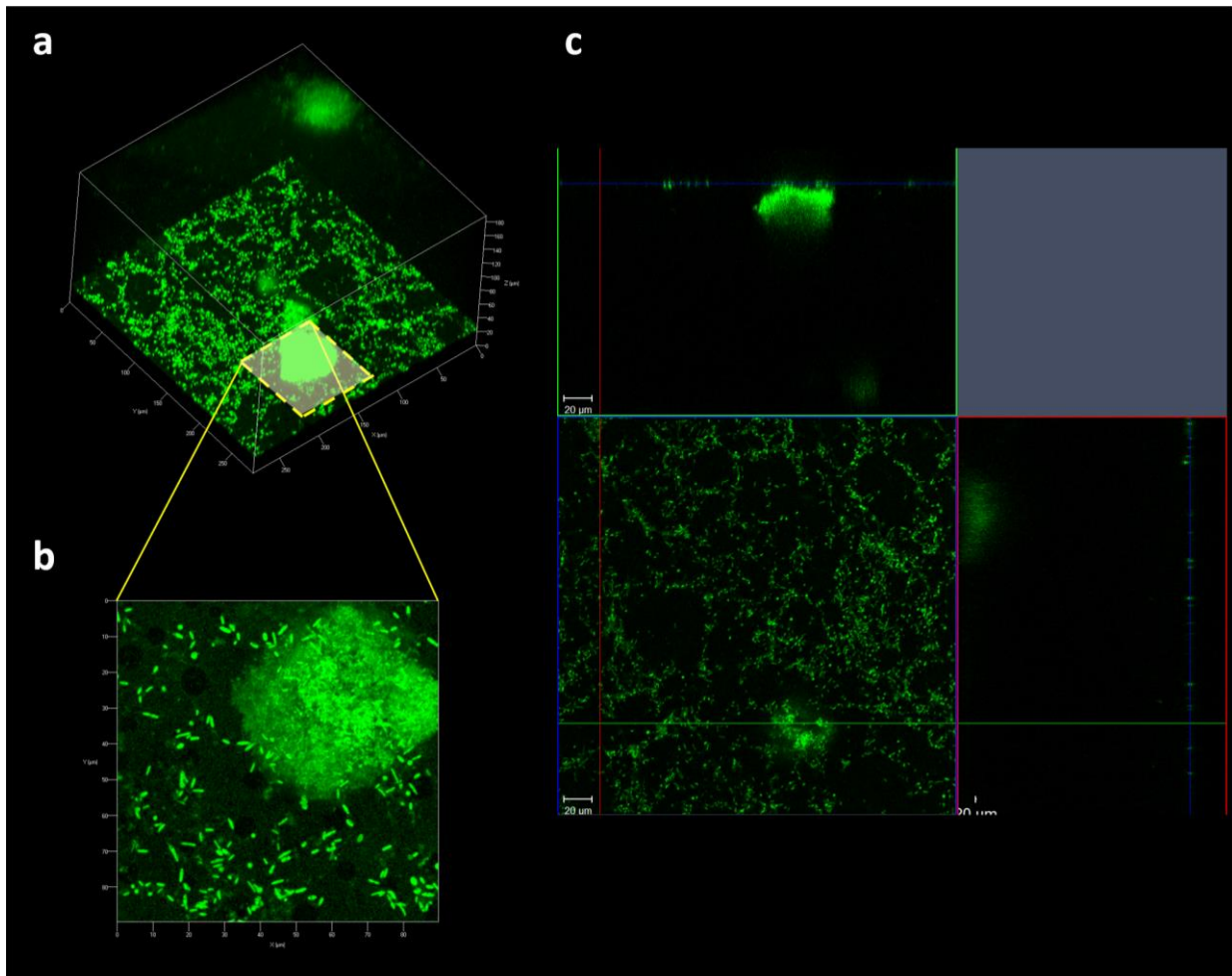


Figure 64 : Observation d'un biofilm de *P. aeruginosa* infecté par les bactériophages après 20 heures d'exposition aux virus. a – reconstitution en trois dimensions de la zone étudiée ; b – image en deux dimensions selon les axes x, y d'une section contenant un amas cellulaire ; c – coupes orthogonales.

La mort et le processus de lyse au sein des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 ont été observées par Webb *et al.* (2003) lors de croissances bactériennes dans des réacteurs à écoulement en verre. En utilisant un marquage de viabilité BacLight LIVE/DEAD, la mort cellulaire se produisait avec une organisation temporelle et spatiale dans le biofilm, à l'intérieur de microcolonies sous forme de zones circulaires, légèrement plus grandes que celles observées dans la figure 64b. Après 12 jours de développement du biofilm, jusqu'à 50 % des microcolonies dans les biofilms présentaient une mort et une lyse en leur centre.

Dans le cas d'une prédation par les bactériophages, les zones circulaires sombres observées dans la figure 64b seraient en réalité des marques témoignant d'une lyse rapide de petites colonies bactériennes provoquées par la charge virale importante de Domino-17. Les agrégats de biofilms dispersés ne seraient qu'un résidu du biofilm précoce formé lors des quatre premières heures de croissance où les bactériophages étaient absents. Mais cela pourrait également correspondre à des résidus cellulaires agrégés.

Dans la figure 64c, une coupe orthogonale sur une aire plus élargie a été réalisée. De larges zones de lyse exemptes de bactéries sont également visibles à cette échelle. La population bactérienne résiduelle lors de l'observation recouvre une grande partie de la surface, mais l'absence de matrice polysaccharidique du biofilm témoigne de la difficulté de développement de la souche bactérienne face à l'action des bactériophages. L'efficacité des phages contre la production du biofilm de *P. aeruginosa* est donc avérée mais ils n'empêchent pas nécessairement le développement bactérien.

IV. APPLICATION DE LA METHODE HYPERFREQUENCE

1. Propriétés diélectriques des bactériophages

Le développement de *P. aeruginosa* sous forme de biofilm et son inhibition par la présence de bactériophage ayant été étudiés en détail, le suivi en temps réel de l'action des phages sur la croissance du film peut être établi. Mais avant d'entreprendre les cinétiques de croissance, l'évaluation de l'impact des phages sur la réponse du capteur a dû être mesurée. La figure 65 représente le coefficient de réflexion S_{11} de l'air, du milieu M1 stérile, du milieu M1 contenant une charge virale importante ainsi qu'une mesure réalisée une heure après l'ajout des virus afin de mettre à jour un éventuel effet d'adsorption sur la sonde. Les résultats montrent une gamme d'évolution du coefficient S_{11} comprise entre -0,5 et -1,75 dB pour les échantillons liquides. Cette plage de variation est bien différente de celle observée dans le chapitre II avec l'utilisation du milieu de culture TSB. Cet écart peut être expliqué par la composition assez éloignée des deux milieux de culture. Cela impacte peu le développement cellulaire, car une abondance de nutriments est disponible dans les deux cas, mais les propriétés électriques diffèrent, notamment au niveau de la conductivité électrique à température ambiante. Pour rappel, la conductivité du milieu TSB à 19°C est de 1,47 S/m contre 0,67 S/m pour le milieu M1. Néanmoins, les valeurs au-delà de 1,0 GHz convergeaient vers -2 dB pour le TSB. Les résultats obtenus dans le milieu M1 semblent tendre vers cette valeur sur les hautes fréquences car, dans ce domaine, les phénomènes de relaxation dipolaire de l'eau (solvant majoritaire des deux milieux) prennent le pas sur la conductivité ionique.

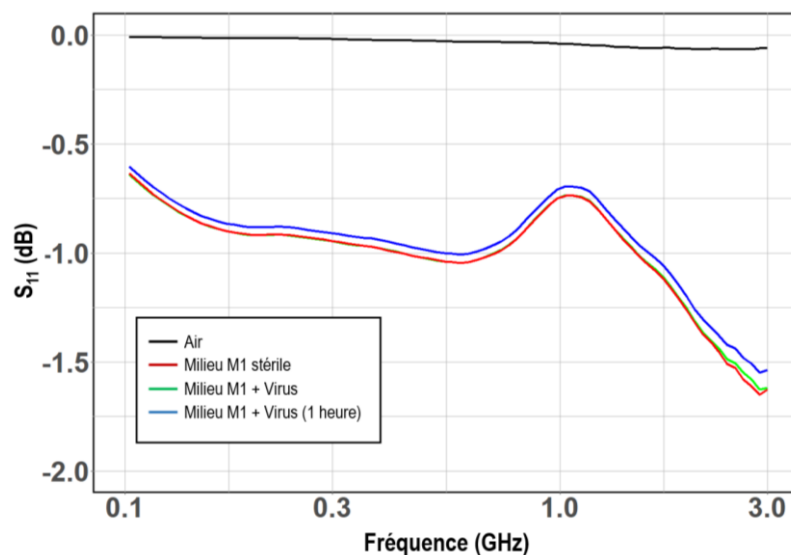


Figure 65 : Caractérisation hyperfréquence des bactériophages en suspension dans le milieu de culture M1.

Il a été observé qu'une teneur importante de particules virales n'impacte pas les caractéristiques diélectriques du milieu. Après une attente de 60 minutes, une légère hausse des valeurs est observée. Cependant, ce biais rentre dans la gamme d'incertitude de mesure et ne représente pas de changement significatif. Il sera donc admis pour la suite des expérimentations que les bactériophages n'impactent pas de manière significative les mesures compte tenu des variations observées par le capteur lors des essais précédents.

2. Etude de l'effet bactéricide des phages avec le capteur radiofréquence

2.1. Evaluation de la synergie virale

La thérapie monophagique est utilisée pour réaliser une preuve de concept lors du développement de modèles expérimentaux de thérapie par les phages, comme dans certaines circonstances où des phages à spectre d'hôtes suffisamment large sont disponibles. Cette approche a l'avantage de simplifier le traitement puisqu'un seul effort de préparation et de purification des phages est nécessaire et qu'il y a moins de risques de complications dues à l'interaction immunologique des phages avec les sujets traités. Cependant, l'utilisation d'un seul type de phage peut entraîner des phénomènes de résistance bactérienne accrue et grandement diminuer les bénéfices d'une thérapie phagique ou d'un biocontrôle des populations bactériennes. Cela ne signifie pas que la thérapie monophagique n'a pas été couronnée de succès, mais plutôt qu'il existe un certain nombre de stratégies permettant d'améliorer les résultats de la thérapie phagique. L'une de ces stratégies est la formulation de cocktails de phages, comme celui utilisé dans ce chapitre. Son efficacité a été testée à l'aide du capteur radiofréquence.

La figure 66 présente le comparatif d'une inhibition de croissance de *P. aeruginosa* par l'action d'un phage unique Domino-17 et d'un cocktail de phages Domino. La courbe bleue correspond à l'effet d'un seul type de phage sur la croissance bactérienne. Lors de l'inoculation des virions, le coefficient S_{11} augmente rapidement. La conductance locale a de nouveau augmenté brusquement après l'injection des virus, indiquant une augmentation de la densité cellulaire. Le signal S_{11} diverge progressivement de la ligne de référence après 6 heures d'incubation. Les faibles variations indiquent toujours une régulation de la densité cellulaire par les phages. Les deux signaux sont superposés à la fin de l'expérience. C'est-à-dire que les propriétés diélectriques des solutions sont identiques après 34 heures. L'utilisation du cocktail de phages est représentée par la courbe rouge dans la figure 66. Contrairement à la régulation monophage, l'injection de multiples phages provoque la formation d'une succession de vagues

d'ampleur variable sur le signal S_{11} . Cette dynamique de type proie-prédateur, détaillée dans la section suivante, met l'accent sur la véhémence de la compétition qui survient au sein du capteur entre le virus et son hôte ainsi que sur les formidables capacités d'adaptation et de résistance des micro-organismes présents. Aucun état d'équilibre statique ne semble apparaître à la fin de l'expérience soulignant l'effet synergique positif de l'utilisation d'un cocktail de phage face à une monothérapie.

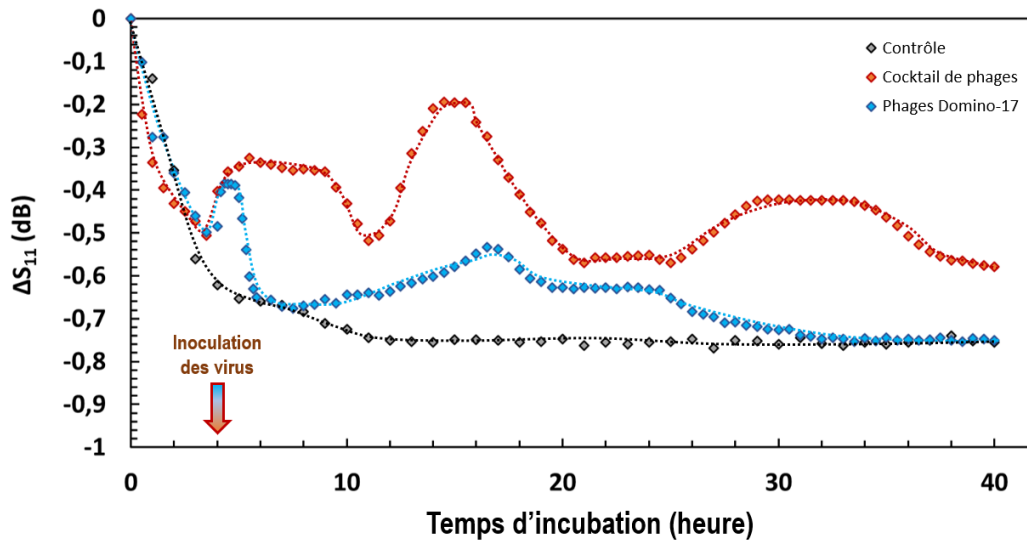


Figure 66 : Etude de l'effet synergique d'un cocktail de phage comparé à l'utilisation d'un phage unique pour l'inhibition de croissance de *P. aeruginosa*. Mesures réalisées avec le capteur radiofréquence, $f = 300$ MHz.

2.2. Relation prédateur / hôte

De nombreuses études sont prometteuses quant à l'utilisation des phages en tant que substitut aux antibiotiques pour traiter les biofilms, mais aucune ne décrit à ce jour complètement les dynamiques de développement des virus aux dépens de celles des hôtes. Les articles les plus récents présentent des mesures réalisées tous les jours, ou au mieux toutes les heures, nécessitant de nombreux et fastidieux comptages cellulaires (Byun *et al.*, 2022; Gula *et al.*, 2020; Xuan *et al.*, 2022). Au regard du caractère extrêmement dynamique de la relation hôte/virus, des informations précieuses sur l'évolution de la densité cellulaire peuvent passer inaperçues avec des méthodes de mesure à temps fixes (comme par exemple les observations microscopiques ou l'utilisation de molécules létales). Ceci est d'autant plus vrai avec des hôtes ayant des métabolismes élevés et des temps de générations courts, ce qui est très souvent le cas avec les bactéries pathogènes de l'homme. L'objectif des mesures radiofréquences est d'apporter une vision plus précise de cette dynamique entre les populations bactériennes et leurs prédateurs.

Cette expérience réalisée avec le capteur vise à comparer les valeurs du coefficient S_{11} obtenues lors de la croissance de *P. aeruginosa* en présence de virions par rapport à l'expérience précédente. Les résultats sont représentée dans la figure 67. La courbe noire correspond au témoin, identique sur les figures 66 et 67. Le coefficient S_{11} décroît avec le temps et met en évidence deux phases qui ont déjà été observées dans le chapitre II (croissance planctonique et formation d'un biofilm). Le point de rupture de pente apparaît après 8 heures d'incubation. Cependant, alors que la variabilité totale du coefficient S_{11} n'est que seulement de -7,75 dB, la caractérisation diélectrique de la croissance de *P. aeruginosa* dans le milieu TSB affichait une chute totale de presque -1,6 dB à la même fréquence. Cette observation apporte une preuve supplémentaire que la nature des milieux de culture joue un rôle important sur la réponse du capteur, en raison des différences de composition initiales. La courbe orange de la figure 67 correspond à la cinétique de croissance de la bactérie en présence d'un cocktail de phages Domino. Immédiatement après l'injection des virus (après 4h d'incubation), le coefficient S_{11} inverse brusquement sa dynamique et affiche une hausse de 0,2 dB en quelques dizaines de minutes. Une phase stationnaire subséquente d'une durée de 9 heures s'installe puis le signal affiche à nouveau une brève chute tout de suite suivie d'une seconde hausse plus intense que la première, impliquant une hausse du signal de 0,4 dB en 10 heures. Le coefficient S_{11} rattrape ensuite son niveau le plus bas à -0,6 dB et reste stationnaire jusqu'à la fin de l'expérience.

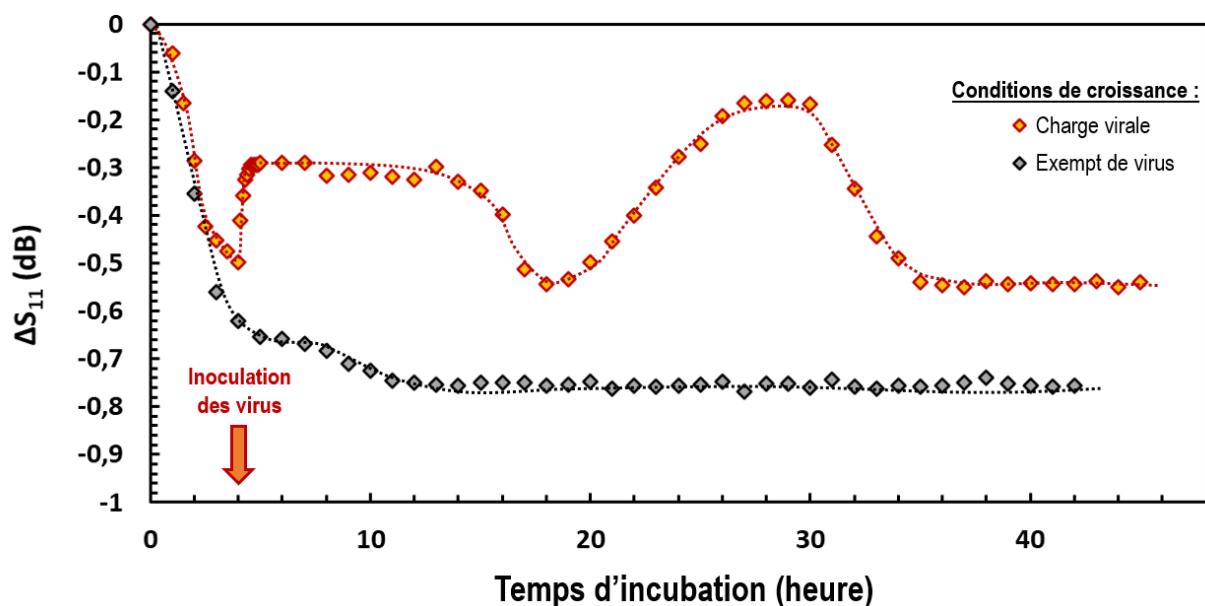


Figure 67 : Etude de l'effet inhibiteur du cocktail de phages sur la croissance de *P. aeruginosa* réalisée avec le capteur radiofréquence, $f = 300$ MHz.

En tant que prédateurs, les phages peuvent exercer une pression de sélection et transformer la composition de la communauté bactérienne. Un exemple clair est la sélection de mutants résistants aux phages, qui peuvent présenter des phénotypes supplémentaires tels que

l'atténuation ou l'accentuation de la virulence, dans le cas d'un cycle lysogénique. Des mutants de *P. aeruginosa* résistants aux phages peuvent par exemple produire davantage de toxines extracellulaires (Hosseinidou *et al.*, 2013). De plus, Davies *et al.* (2016) ont observé que la pression de sélection exercée par les phages lysogéniques peut accélérer l'évolution adaptative des agents pathogènes bactériens pendant l'infection de la cellule hôte. Ainsi, il semble que l'exposition aux bactériophages puisse améliorer l'adaptabilité et/ou la virulence des bactéries. Dans le cas du système hôte-virus présenté dans ce manuscrit, l'hypothèse expliquant ces oscillations est la présence d'un phénomène de remplacement perpétuel des hôtes et des virus dominants, appelé dynamique de la Reine Rouge (Van Valen, 1973). Elle est considérée comme un facteur important du maintien de la biodiversité (Vandermeer, 2006). D'après ce modèle, les virus infectent de préférence des hôtes très abondants et présentant un degré élevé d'uniformité génétique, ce qui confère aux types d'hôtes rares un avantage au cours de la coévolution hôte-parasite par rapport aux hôtes abondants (Johnson *et al.*, 2013). Dans le cadre de cette étude, un seul type d'hôte est présent. Néanmoins, les bactéries présentant naturellement des gènes de résistance à l'infection phagique représentent la catégorie des « hôtes rares ». Les fluctuations observées avec le capteur RF pourraient donc correspondre à la dynamique d'adaptation de la souche PAO1 face à l'attaque des phages, chaque vague représentant la prolifération d'un groupe de pathogène résistant.

Un autre mécanisme impliqué dans l'évolution microbienne est le transfert horizontal de gènes. Les phages sont des médiateurs connus de ce processus (Magaziner *et al.*, 2019), et ont été associés à la propagation de traits de virulence et/ou de résistance au sein des communautés bactériennes, le plus souvent chez les phages lysogéniques. Haaber *et al.* ont présenté un modèle d'autotransduction qui explique la dissémination par les phages des déterminants de la résistance aux antibiotiques parmi les souches de *Staphylococcus aureus* (Haaber *et al.*, 2016). Les bactériophages peuvent également favoriser la transformation génétique à grande échelle par transformation naturelle. Keen *et al.* ont décrit des phages lytiques appelés "superspreaders" qui peuvent libérer de l'ADN plasmidique intact dans le milieu environnant et peuvent également favoriser la mobilisation des gènes au sein des populations bactériennes (Keen *et al.*, 2017). De plus, les éléments génétiques mobiles peuvent se déplacer entre ou à l'intérieur du génome d'un hôte. Les génomes de nombreuses espèces bactériennes contiennent de multiples éléments mobiles fonctionnels, notamment des séquences d'ADN, des phages tempérés, des phages satellites ou même des îlots génomiques. Dans certains cas, ces éléments constituent une partie importante du génome de l'hôte (Darmon & Leach, 2014). De multiples éléments au sein d'un hôte donné ont le potentiel d'interagir les uns avec les autres, et probablement de coévoluer.

En plus de modifier le patrimoine génétique des communautés microbiennes, les bactériophages lytiques peuvent moduler l'état physiologique des bactéries sans modification du génome. L'analyse de ces réponses à la prédation phagique a été facilitée par l'arrivée des techniques "omiques". Une grande quantité de données issues d'analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques des microbes après exposition aux phages sont en effet maintenant disponibles. Il est intéressant de noter que les changements les plus spectaculaires semblent se produire à des étapes tardives de l'infection, comme celles de l'assemblage des virions et de la production d'enzymes lytiques (Morimoto *et al.*, 2018; Nilsson *et al.*, 2022). Il est également prouvé que les réponses transcriptionnelles varient en fonction de la souche bactérienne spécifique (Doron *et al.*, 2016) et du bactériophage (Blasdel *et al.*, 2017; De Smet *et al.*, 2016). La plupart des études réalisées à ce jour ont évalué les réponses des cellules bactériennes après une infection synchronisée avec des phages virulents ou après l'induction du cycle lytique chez les bactéries lysogéniques. Ces informations permettent de comprendre les interactions moléculaires entre le phage et la cellule bactérienne hôte tout au long du cycle de réplication.

Compte tenu de ces résultats par rapport aux précédents (figure 66), l'activité virale semble inconstante. Les stades de lyse et de recrudescence bactérienne ne se produisent pas systématiquement à des instants précis. Les deux répliques avec cocktail de phages (courbes oranges sur les figures 66 et 67) affichent des dynamiques éloignées. Sur des mesures capteurs de 40 heures, le nombre de cycles de lyse était de 3 dans un cas et de 2 dans un autre. Pourtant, la dynamique des deux premiers cycles apparaît étroitement liée. Le premier plateau faisant suite à l'injection de virions est suivi d'une seconde hausse, plus importante que la précédente. De ce phénomène émerge deux hypothèses selon lesquelles (i) l'activité virale semble être catalysée par des processus biologiques et/ou physiques lors de l'étude de l'efficacité des cocktails de phages et (ii) la mise à disposition des nutriments générés par la lyse virale pourrait ponctuellement favoriser la croissance des populations bactériennes résistantes. La littérature scientifique sur la cinétique d'action des phages est encore pauvre. De plus, chaque type de bactériophages présente des taux d'infection et de réplication différents. Ce paramètre dépend de tellement de facteurs qu'il est actuellement difficile de fournir des éléments de réponse fiables à ces deux hypothèses, bien que ce soit des processus équivalents.

L'ensemble des informations sur la prédation des phages sur l'hôte permettent de mieux comprendre les résultats obtenus avec la sonde coaxiale. La succession de vagues provoquées par l'injection des virions dans la culture cellulaire pourrait se traduire par une fluctuation importante de la conductivité localisée aux abords de la sonde coaxiale. Comme observé dans le chapitre II de ce manuscrit, ces changements de conductivité sont régis essentiellement par les fluctuations

de la densité cellulaire. Chaque cellule bactérienne agit comme un réservoir d'ions pouvant se polariser sous l'action du champ électromagnétique généré par la sonde aux fréquences de la gamme employée. Leur quantité est proportionnelle aux variations du coefficient de réflexion normalisé ΔS_{11} . L'hypothèse selon laquelle une vague individuelle correspond à l'émergence d'une variante possédant des traits de résistance à l'infection des phages pourrait expliquer les phénomènes observés. Une seconde hypothèse soutenue par la littérature scientifique serait que les phages s'adaptent à leur tour pour réinfecter l'hôte, conduisant à la succession, en théorie infinie, de ces cycles.

Ces résultats décrivent en réalité un phénomène de régulation des populations bactérienne et virale de type proie/prédateur. L'ajout d'une charge virale conséquente (MOI = 10), après 4 heures de croissance, provoque la lyse de nombreuses cellules, traduit par la hausse soudaine du coefficient S_{11} . La mort rapide des cellules infectées combinée à un facteur de stress causé par la présence des virions ont engendré un forçage évolutif via la sélection et l'expression de gènes de résistance présents au sein de la communauté bactérienne. Ces gènes exprimés par la majorité des cellules des générations suivantes favorisent la résistance aux phages et entraînent une nouvelle chute du coefficient S_{11} correspondant à une recrudescence de bactéries résistantes. Néanmoins, la relation proie/prédateur qu'entretiennent les phages et les procaryotes est par essence très dynamique et représente une parfaite illustration de la théorie de la Reine Rouge (Williams, 2010). Les bactériophages s'adaptent donc constamment à leur proie. Ainsi, ils peuvent à nouveau infecter les bactéries résistantes en étant eux même soumis à un forçage évolutif. Leur stratégie réside dans le fait qu'ils ne possèdent pas, à priori, de système de correction de leur matériel génétique, par conséquent les mutations s'effectuent à un rythme beaucoup plus rapide ce qui permet l'émergence de contre-mesures virales. De fait, si la course aux armements est permanente, *in fine*, les phages possèdent toujours l'initiative pour « gérer » leur réservoir de proie dans un système naturel. Les résultats de cette expérience soulignent le caractère encore trop parcellaire des connaissances acquises sur les bactériophages et leur mode d'action. Deux cycles de prédation ont été observés en temps réel lors de cette expérience. Une analyse sur une période plus grande pourrait révéler d'autres cycles voire une synchronisation. Ces perspectives marquent d'autant plus l'intérêt d'utiliser une méthode en temps réel.

V. CONCLUSIONS

Ce travail visait à valider le capteur radiofréquence en employant la méthode élaborée dans le chapitre II dans un domaine d'intérêt actuel. Il a été possible d'observer l'évolution de la croissance de *P. aeruginosa*, en présence du phage Domino-17 et d'un cocktail de phages Domino, *in situ* et en temps réel.

Les observations au microscope confocal à balayage laser mettent en avant la force lytique importante des phages Domino face à la souche PAO1. En leur présence, la formation du biofilm est fortement retardée. Son architecture est perturbée à un tel point que seuls quelques agrégats de cellules enveloppées de matrice extracellulaire restent visibles après 24 heures de coévolution avec les virions.

De plus, les résultats indiquent que l'utilisation d'un cocktail de phages est beaucoup plus efficace pour inhiber la croissance de la souche PAO1 en raison des mécanismes de course à l'armement et de la Reine Rouge qui ont été décrits dans le passé. Ce travail fournit des pistes de validation de ces phénomènes par une toute nouvelle approche. Bien qu'il soit possible de retracer l'évolution de la densité cellulaire au sein du capteur sur la gamme de fréquence employée, la population virale reste cependant invisible avec cette méthode. La faible taille des particules virales ainsi que leur composition sont des éléments qui rendent leur polarisation impossible ou trop faible sur cette gamme fréquentielle.

Enfin, seuls trois cycles d'adaptation ont été observés. Il aurait été idéal de réaliser un suivi sur une période de temps élevé (plusieurs jours/semaines) afin de détecter un éventuel schéma temporel lié au métabolisme global de *P. aeruginosa* et valider davantage les hypothèses émises. Un second axe d'amélioration serait l'utilisation d'un marqueur spécifique aux virus afin d'établir une cartographie de leur répartition au sein des échantillons durant les observations au microscope confocal à balayage laser.

L'intérêt d'utiliser une méthode de caractérisation en temps réel a été pleinement démontré dans ce chapitre. De telles conclusions n'auraient pu être apportées avec de simples observations microscopiques. La méthode radiofréquence est une technique de mesure complémentaire à haut potentiel car elle apporte une toute nouvelle approche de l'étude des systèmes biologiques complexes.

REFERENCES

- Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. Citeseer.
- Azeredo, J., Oliveira, H., Costa, A.R., Shneider, M., Sillankorva, S., 2018. Bacteriophage polysaccharide depolymerases, their role and biotechnological applications.
- Blasdel, B.G., Chevallereau, A., Monot, M., Lavigne, R., Debarbieux, L., 2017. Comparative transcriptomics analyses reveal the conservation of an ancestral infectious strategy in two bacteriophage genera. *ISME J.* 11, 1988–1996.
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., Navarro, F., 2016. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep.* 6, 1–8.
- Byun, K.-H., Han, S.H., Choi, M.W., Kim, B.-H., Park, S.H., Ha, S.-D., 2022. Biofilm eradication ability of phage cocktail against *Listeria monocytogenes* biofilms formed on food contact materials and effect on virulence-related genes and biofilm structure. *Food Res. Int.* 111367.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A., Connerton, I.F., Payne, R.J., 2009. Quantitative models of in vitro bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog.* 5, e1000253.
- Cairns, J., Frickel, J., Jalasvuori, M., Hiltunen, T., Becks, L., 2017. Genomic evolution of bacterial populations under coselection by antibiotics and phage. *Mol. Ecol.* 26, 1848–1859.
- Casjens, S., 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.* 49, 277–300.
- Chan, B.K., Siström, M., Wertz, J.E., Kortright, K.E., Narayan, D., Turner, P.E., 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 6, 1–8.
- Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P.Ø., Høiby, N., 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–15.
- Clément, K., 2021. Multi-level characterization of bacteriophage T5 capsids and capsid-like particles using mass spectrometry. (PhD Thesis). Université Grenoble Alpes [2020-....].
- Cormier, J., Janes, M., 2014. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. *J. Virol. Methods* 196, 86–92.
- d'Herelle, M.F., 1961. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acta Kravsi.*
- Darmon E, Leach DRF. Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2014 Mar; 78(1):1– 39
- Davies, E.V., James, C.E., Williams, D., O'Brien, S., Fothergill, J.L., Haldenby, S., Paterson, S., Winstanley, C., Brockhurst, M.A., 2016. Temperate phages both mediate and drive adaptive evolution in pathogen biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 8266–8271.
- De Smet, J., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Ceysens, P.-J., Vermaelen, W., Blasdel, B., Bin Jang, H., Sauer, U., Lavigne, R., 2016. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *ISME J.* 10, 1823–1835.
- del Rio, B., Binetti, A.G., Martín, M.C., Fernandez, M., Magadan, A.H., Alvarez, M.A., 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* 24, 75–81.
- Doron, S., Fedida, A., Hernández-Prieto, M.A., Sabehi, G., Karunker, I., Stazic, D., Feingersch, R., Steglich, C., Futschik, M., Lindell, D., 2016. Transcriptome dynamics of a broad host-range cyanophage and its hosts. *ISME J.* 10, 1437–1455.
- Garneau, J.E., Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb. Cell Factories* 10, 1–10.
- Geredew Kifelew, L., Mitchell, J.G., Speck, P., 2019. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. *Biofouling* 35, 472–481.
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., 2012. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS One* 7, e31698.
- Gula, G., Szymanowska, P., Piasecki, T., Góras, S., Gotszalk, T., Drulis-Kawa, Z., 2020. The application of impedance spectroscopy for *Pseudomonas* biofilm monitoring during phage infection. *Viruses* 12, 407.
- Haaber, J., Leisner, J.J., Cohn, M.T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J.B., Westh, H., Penadés, J.R., Ingmer, H., 2016. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat. Commun.* 7, 1–8.
- Hall, A.R., De Vos, D., Friman, V.-P., Pimay, J.-P., Buckling, A., 2012. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5646–5652.
- Hanlon, G.W., 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 118–128.
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I., 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol. J.* 9, 1–8.
- Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., Balcão, V.M., 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.* 212, 38–58.
- Holloway, B.W., Egan, J.B., Monk, M., 1960. Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 38, 321–330.

- Hosseinidoust, Z., Van De Ven, T.G., Tufenkji, N., 2013. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence as a result of phage predation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6110–6116.
- Irie, Y., Roberts, A.E., Kragh, K.N., Gordon, V.D., Hutchison, J., Allen, R.J., Melaugh, G., Bjarnsholt, T., West, S.A., Diggle, S.P., 2017. The *Pseudomonas aeruginosa* PSL polysaccharide is a social but noncheatable trait in biofilms. *MBio* 8, e00374-17.
- Jaiswal, A., Koley, H., Ghosh, A., Palit, A., Sarkar, B., 2013. Efficacy of cocktail phage therapy in treating *Vibrio cholerae* infection in rabbit model. *Microbes Infect.* 15, 152–156.
- Johnson, P.T., Preston, D.L., Hoverman, J.T., Richgels, K.L., 2013. Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 494, 230–233.
- Keen, E.C., Bliskovsky, V.V., Malagon, F., Baker, J.D., Prince, J.S., Klaus, J.S., Adhya, S.L., 2017. Novel “superspreader” bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation. *MBio* 8, e02115-16.
- Kellenberger, G., Kellenberger, E., 1957. Electron microscopical studies of phage multiplication: III. Observation of single cell bursts. *Virology* 3, 275–285.
- Khan, M.S., Pande, T., van de Ven, T.G., 2015. Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper based sandwich ELISA. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 132, 264–270.
- Lelchat, F., Cérantola, S., Brandily, C., Collic-Jouault, S., Baudoux, A. C., Ojima, T., & Boisset, C. (2015). The marine bacteria *Cobetia marina* DSMZ 4741 synthesizes an unexpected K-antigen-like exopolysaccharide. *Carbohydrate polymers*, 124, 347-356.
- Lelchat, F., Cérantola, S., Ojima, T., Michel, G., Collic-Jouault, S., Baudoux, A. C., & Boisset, C. (2019). Blue Biotech Goes Viral: Phages Borne Enzymes for a Better Valorization of Marine Bacterial Exopolysaccharides.
- Lelchat, F., 2020. Phages et biotechnologies. *Techniques de l'ingénieur.*
- Li, K., Wang, H., Zhang, R., 2015. qPCR detection of *Rhodobacter sphaeroides* phage in the Co [Q. sub. 10] production. *J. Pure Appl. Microbiol.* 9, 1793–1797.
- Love, M.J., Bhandari, D., Dobson, R.C., Billington, C., 2018. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. *Antibiotics* 7, 17.
- Ly-Chatain, M.H., Durand, L., Rigobello, V., Vera, A., Demarigny, Y., 2011. Direct quantitative detection and identification of Lactococcal bacteriophages from milk and whey by real-time PCR: application for the detection of Lactococcal bacteriophages in Goat's raw milk whey in France. *Int. J. Microbiol.* 2011.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 5, e1000354.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose-and mannose-rich exopolysaccharide.
- Magaziner, S.J., Zeng, Z., Chen, B., Salmond, G.P., 2019. The prophages of *Citrobacter rodentium* represent a conserved family of horizontally acquired mobile genetic elements associated with enteric evolution towards pathogenicity. *J. Bacteriol.* 201, e00638-18.
- McCallin, S., Sacher, J.C., Zheng, J., Chan, B.K., 2019. Current state of compassionate phage therapy. *Viruses* 11, 343.
- Michelsen, O., Cuesta-Dominguez, Á., Albrechtsen, B., Jensen, P.R., 2007. Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* by using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7575–7581.
- Morimoto, D., Kimura, S., Sako, Y., Yoshida, T., 2018. Transcriptome analysis of a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* during Ma-LMM01 phage infection. *Front. Microbiol.* 9, 2.
- Mukherjee, S., Bassler, B.L., 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 371–382.
- Nilsson, E., Li, K., Hoetzinger, M., Holmfeldt, K., 2022. Nutrient driven transcriptional changes during phage infection in an aquatic Gammaproteobacterium. *Environ. Microbiol.*
- Oliveira, H., São-José, C., Azeredo, J., 2018. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy. *Viruses* 10, 292.
- Passos da Silva, D., Matwichuk, M.L., Townsend, D.O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat. Commun.* 10, 1–11.
- Reichhardt, C., Parsek, M.R., 2019. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front. Microbiol.* 10, 677.
- Stanek, J.E., Falkinham III, J.O., 2001. Rapid coliphage detection assay. *J. Virol. Methods* 91, 93–98.
- Tayyarcan, E.K., Acar Soykut, E., Boyaci, I.H., 2018. A Raman-spectroscopy-based approach for detection and discrimination of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* phages at low titer in raw milk. *Folia Microbiol. (Praha)* 63, 627–636.
- Twort, F.W., 1961. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Acta Kravsi.*
- Valentine, M.E., Kirby, B.D., Withers, T.R., Johnson, S.L., Long, T.E., Hao, Y., Lam, J.S., Niles, R.M., Yu, H.D., 2020. Generation of a highly attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* for commercial production of alginate. *Microb. Biotechnol.* 13, 162–175.
- Van Valen, L., 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1–30.

- Vandermeer, J., 2006. Oscillating populations and biodiversity maintenance. *Bioscience* 56, 967–975.
- Wang, M.S., Nitin, N., 2014. Rapid detection of bacteriophages in starter culture using water-in-oil-in-water emulsion microdroplets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8347–8355.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 185, 4585–4592.
- Whitfield, G.B., Howell, P.L., 2021. The Matrix Revisited: Opening night for the Pel polysaccharide across eubacterial kingdoms. *Microbiol. Insights* 14, 1178636120988588.
- Williams, H., 2010. Virus-host coevolution, killing the winner, and the Red Queen., in: *ALIFE*. p. 459.
- Wittebole, X., De Roock, S., Opal, S.M., 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5, 226–235.
- Xuan, G., Lin, H., Tan, L., Zhao, G., Wang, J., 2022. Quorum sensing promotes phage infection in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mbio* 13, e03174-21.
- Yan, S., Wu, G., 2019. Can biofilm be reversed through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Front. Microbiol.* 10, 1582.

CONCLUSIONS GENERALES

La grande majorité des micro-organismes sont présents dans l'environnement sous forme de biofilm, une forme extrême de résistance qui confère une protection accrue contre les effets biocides des agents antimicrobiens. Les biofilms bactériens peuvent être présents à la fois dans les milieux liquides, à la surface de l'eau et à la surface des substrats immergés. Les biofilms induisent des effets néfastes pour les industries marines, alimentaires et médicales. Leur présence quasi inévitable sur les équipements immergés constitue une menace directe pour l'écologie planétaire, la durabilité des matériaux et la santé (animale et humaine).

Divers travaux ont permis de concevoir de nouvelles stratégies innovantes et prometteuses pour surmonter la résistance bactérienne et la toxicité environnementale des stratégies conventionnelles (notamment des sous-produits). Mais ces stratégies requièrent en général d'être appliquées pendant les premiers stades de croissance des biofilms. Les industries doivent donc être en mesure de détecter rapidement les biofilms à l'aide d'outils simples d'utilisation et peu coûteux. La revue bibliographique du chapitre I présente les principales techniques de détection utilisées pour caractériser les biofilms. Alors que l'imagerie permet d'obtenir des informations visuelles sur le biofilm, les méthodologies de détection se concentrent sur la quantification des analytes ou la caractérisation des propriétés électriques du biofilm. En particulier, les nouveaux dispositifs de détection visent à surmonter certaines limites des méthodes actuelles pour les études sur les biofilms, qui impliquent généralement des analyses invasives et destructives. En raison de la nature hétérogène de la structure du biofilm, des techniques de détection spécifiques doivent être employées. La caractérisation non invasive des biofilms microbiens a été réalisée en utilisant principalement des technologies de détection basées sur des capteurs électrochimiques. Leur principe de détection est à la base de ce que l'on appelle la microbiologie d'impédance, où la variation de l'impédance entre deux électrodes exposées aux bactéries est utilisée pour identifier la présence de micro-organismes. Cette approche a permis de détecter la croissance bactérienne en temps réel en mesurant les variations de la conductance, de l'impédance ou de la capacité de la suspension bactérienne. Les capteurs électrochimiques basés sur ces technologies demandent néanmoins des conditions de travail très spécifiques dues à leur grande sensibilité. Les exigences d'installations et les variations temporelles des conditions de mesure impliquent d'avoir une vigilance accrue sur les résultats obtenus. De même, les microélectrodes interdigitées (IDE) ont été utilisées pour la détection d'échantillons biologiques par impédance. À cet égard, les systèmes à base d'IDE peuvent être avantageux par rapport aux systèmes d'électrodes conventionnels dans la mesure où l'IDE peut détecter des changements de capacité pour surveiller la croissance bactérienne. Néanmoins, les signaux sont sujets à des saturations rapides et nécessitent l'utilisation de circuits équivalents parfois complexes.

Au sein des biofilms, les cellules et les substances extracellulaires font office de matériaux diélectriques et sont donc responsables de la variation temporelle de la permittivité diélectrique, la composition ou l'état métabolique du biofilm. Comme expliqué dans le chapitre II, l'application de la méthode dans la gamme de fréquences de 0,1 à 3 GHz présente un intérêt particulier pour le développement de capteurs à faible coût, car la technologie liée aux sondes coaxiales est abordable. Ainsi ces travaux de thèse se sont concentrés sur le développement d'un capteur micro-ondes qui met en évidence la transition entre la croissance des bactéries et la formation du biofilm afin de répondre à un double objectif :

- (1) Répondre au besoin grandissant de développement de nouveaux outils de détection des biofilms,
- (2) Apporter une solution à bas coût et efficace en temps réel qui pourra potentiellement dans le futur être transposée à divers systèmes industriels.

Dans ce but, une sonde RF basée sur une ligne de transmission coaxiale ouverte a été développée et étudiée par des simulations électromagnétiques soulignant la forte influence de la variation de la conductivité électrique associée à la croissance des bactéries et du biofilm sur la réponse du capteur. Les propriétés physiologiques des deux bactéries acquises depuis plusieurs décennies en font des modèles d'étude appropriés pour le développement du capteur dans des conditions d'analyse contrôlées. La comparaison des résultats expérimentaux sur ces deux bactéries avec les simulations électromagnétiques prouve la capacité du capteur à séparer la formation du biofilm de la croissance en suspension, ce qui constitue un réel avantage en plus de la rapidité d'analyse et de la sensibilité élevée de la méthode.

Des techniques basées sur l'impédance ont également été utilisées comme méthode de détection et quantification des biofilms dans le troisième chapitre de ce manuscrit. Ces travaux ont démontré que la variation d'impédance pendant la croissance bactérienne se compose de deux éléments qui peuvent être mesurés à différentes plages de fréquence : (i) la variation d'impédance apportée par le milieu et (ii) la variation d'impédance apportée par l'interface électrode/électrolyte, également appelée impédance de la double couche électrochimique. L'impédance de la double couche domine aux basses fréquences (< 10 kHz), tandis que l'impédance du milieu de croissance devient dominante aux fréquences supérieures à 10 kHz. Un modèle simple de circuit équivalent peut être utilisé pour comprendre la dépendance en fréquence des deux impédances sur l'impédance globale. D'autres circuits équivalents proposés dans la littérature peuvent correspondre aux données obtenues mais leur complexité rend leur interprétation délicate vis-à-vis des phénomènes biologiques étudiés.

Enfin, l'utilisation de bactériophages a permis d'explorer une application possible du capteur. Comme expliqué dans le chapitre I, plusieurs études ont montré que les phages peuvent infecter et lyser efficacement les cellules présentes dans les biofilms bactériens mono et plurispécifiques soutenant le concept de phagothérapie comme stratégie alternative ou complémentaire pour prévenir et contrôler le développement des biofilms. L'interaction entre les phages et les biofilms est un processus complexe. En théorie, la proximité des cellules au sein de la structure du biofilm pourrait renforcer l'interaction phage-hôte et faciliter l'infection par les phages et à l'inverse, la structure et la composition du biofilm ainsi que l'état physiologique des cellules du biofilm peuvent constituer un obstacle à l'infection par les phages. Il faut souligner que les modalités d'interaction entre bactériophage et biofilm dépendent fortement de la souche bactérienne hôte, des caractéristiques du phage, de la structure du biofilm et de sa composition. La configuration de la formation du biofilm a un impact significatif sur ses caractéristiques finales, ce qui rend difficile, voire impossible, de tirer des conclusions claires, basées sur l'état de l'art, concernant le traitement phagique des biofilms. En outre, l'efficacité d'un traitement phagique contre les biofilms est basée sur le résultat global de l'infection virale alors que les connaissances sur l'interaction virus/biofilm sont limitées. Les travaux présentés dans le chapitre IV de ce manuscrit se limitent donc aux connaissances actuelles, en soulignant les limites et les obstacles rencontrés.

Ce travail de thèse visait à fournir de nouvelles informations sur la colonisation bactérienne et la formation de biofilms pendant la prédation de bactériophages. Les méthodes habituellement employées comme la cinétique de la densité optique et les observations CLSM ont mis en évidence le manque d'information temporelle qui masque des phénomènes importants apportés par la caractérisation *in situ* en temps réel réalisée avec le capteur de biofilm. Alors que les méthodes classiques montrent seulement la présence d'une lyse bactérienne, les mesures radiofréquence ont clairement mis en évidence un comportement cyclique de déclin et recrudescence bactérienne.

Perspectives ouvertes par ce travail de thèse

Le capteur proposé dans ce manuscrit est un nouvel outil permettant de compléter les méthodes classiques d'analyse des biofilms. Sa force réside dans sa capacité à mesurer la formation d'un biofilm directement dans un milieu de culture bactérien, en temps réel et sans préparation. La sensibilité de la méthode est élevée, permettant de détecter rapidement la formation des biofilms étudiés. Cependant, son fonctionnement n'est à ce jour pas complètement acquis. Plusieurs pistes restent à explorer, dont entre autres :

- L'insertion de la sonde RF dans un système dynamique (par exemple une cellule en flux continu),
- Une étude complète de croissance de biofilms multi-espèces et, par conséquent, l'élaboration d'un modèle plus proche de la réalité,
- L'évaluation de l'utilisation du capteur dans des conditions naturelles, par exemple en milieu aquatique ouvert.

De plus, cette méthode nécessite une bonne connaissance des modèles bactériens visés. Les résultats obtenus ouvrent la discussion sur l'utilisation optimale du capteur pour clarifier les processus biologiques ciblés pendant la formation du biofilm (étude d'un agent antibiofilm, contamination d'une surface, biocorrosion, etc.). L'utilisation de ce type de capteur pourrait être intéressante pour les études bactériennes futures et peut potentiellement améliorer les modèles de croissance actuels. Une application dans le domaine de l'industrie agroalimentaire sera prochainement étudiée. Le capteur sera utilisé en tant qu'outil de biosécurité pour détecter la croissance d'une bactérie pathogène.

Titre : Elaboration d'une nouvelle méthode hyperfréquence pour la détection et le suivi de croissance de biofilms bactériens

Mots clés : Biofilm bactérien, Capteur radiofréquence, Caractérisation diélectrique, Conductivité, Suivi de croissance, Temps réel

Résumé : Les biofilms bactériens ont un impact économique et sanitaire important dans de nombreux domaines. Détecter leur formation sur les surfaces reste un défi majeur pour contrôler les processus de corrosion et de biofouling. Les techniques actuelles de surveillance des biofilms bactériens souffrent de coûts élevés et ont de lourds impacts sur l'intégrité de l'échantillon. Dans cette thèse, le développement d'un capteur radiofréquence en temps réel et sans marquage dédié au suivi de la croissance des biofilms est présenté. La forte sensibilité de la méthode a mis en évidence une détection précoce d'un biofilm. Elle a ensuite été comparée aux techniques électrochimiques basses fréquences. La modification de l'interface électrode-solution pendant

la croissance du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* a été suivie par la mesure in-situ du potentiel en circuit ouvert, spectroscopie d'impédance électrochimique et voltamétrie cyclique. Un second objectif de cette thèse a été également d'explorer l'application de ce nouveau capteur radiofréquence en tant que nouvel outil de support. Il a été possible de suivre la prédation de bactériophages sur la bactérie *P. aeruginosa* à 300 MHz. Plusieurs événements biologiques ont été observés avec le capteur mais n'ont pas été détectés avec les autres méthodes testées. Cette méthode radiofréquence doit donc être considérée comme un outil prometteur pour la surveillance des biofilms en complément des techniques existantes.

Title : Development of a new microwave method for the detection and monitoring of bacterial biofilm growth

Keywords : Bacterial biofilm, Radio frequency sensor, Dielectric characterization, Conductivity, Growth monitoring, Real time

Abstract : Bacterial biofilms have a significant financial and health impact in many fields. It remains a fundamental challenge to understand and detect the formation of microbial biofilms on surfaces to counteract corrosion and biofouling processes. Current technologies for monitoring bacterial biofilm processes suffer from their own limitations and are in some instances very costly or harsh on the sample's integrity. In this thesis, the development of a real-time, label-free radiofrequency sensor dedicated to the monitoring of bacteria and biofilm growth is presented. The high sensitivity of the method highlights the growth of a biofilm at the early state of formation. This method was compared to low frequency electrochemical methods.

The change of the electrode-solution interface during *P. aeruginosa* biofilm growth was monitored by in-situ measurement of the open circuit potential and correlated with the results obtained by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. One of the objectives of this thesis is also to explore the application of this new real-time, label-free radio frequency sensor. It provides a new support tool and was able to track bacteriophage predation on *P. aeruginosa* bacteria at 300 MHz. Several biological events were captured with the sensor but were not detected with the other two methods tested. This proposed method should therefore be considered as a promising tool for biofilm monitoring to complement existing techniques.