

Imagerie de Biofilm en Milieux Poreux par Micro-Tomographie X

A. E. Larue^a, P. Swider^a, P. Duru^a, M. Quintard^a, Y. Davit^a

^aInstitut de Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT) - Université de Toulouse, CNRS-INPT-UPS ; Toulouse FRANCE

Mots clés : biofilm, micro-tomographie X, agents de contraste

1. Introduction

Un biofilm est une colonie microbienne complexe formée sur un substrat solide où les micro-organismes sont enrobés dans une matrice polymérique (composée par exemple de polysaccharides, de lipides, et d'ADN) souvent auto-produite. Les biofilms se développant dans des milieux poreux peuvent induire d'importantes modifications des propriétés de transport (porosité, perméabilité, dispersion, etc.) ; ce qui a des conséquences dans de nombreuses applications liées à l'ingénierie environnementale et médicale (e.g. biofiltres, remédiation des sols, MEOR¹, stockage de CO₂ et H₂, infections orthopédiques² et d'implants). Une grande majorité des phénomènes contrôlant le développement de biofilms en milieux poreux - par exemple, l'impact des contraintes environnementales sur la distribution spatiale des micro-organismes, le lien entre les différentes échelles du problème et l'écologie des biofilms dans des milieux très perturbés - demeurent encore mal compris. Cela est principalement dû aux limitations des méthodes d'imagerie actuelles.

La microscopie confocale à balayage laser, méthode très utilisée pour les biofilms, permet de les imager sur une surface plane avec une résolution de l'ordre du micromètre sur plusieurs millimètres. Cependant son utilisation dans un milieu poreux, donc opaque, est extrêmement limitée. Des méthodes basées sur la RMN sont en voie de développement mais n'offrent pas, actuellement, une résolution spatiale isotrope suffisante pour obtenir la morphologie des biofilms en milieux poreux. Certaines approches utilisant la micro-tomographie X sont également en voie de développement car elles permettent théoriquement d'imager de larges volumes de milieux poreux avec une résolution inférieure au micromètre. En revanche, les coefficients d'absorption pour l'eau et le biofilm sont similaires et il est donc nécessaire d'utiliser des agents de contraste afin de différencier ces deux phases. Dans cette étude, nous présenterons les avancées récentes des méthodes d'imagerie de biofilms basées sur la micro-tomographie X.

2. Méthodes

Nous utilisons une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10145) pour la croissance de biofilm bactérien dans deux types de substrats ; des capillaires en verre de section carrée et des milieux poreux modèles (éponge de Menger fractale, empilement de billes et différentes mousses) obtenus par impression tridimensionnelle. Notre système fluide étant composé d'un contrôleur de pression avec un asservissement de débit, le biofilm se développe à une vitesse de filtration fixée sur une durée de 5 jours.

Après croissance du biofilm, les capillaires en verre sont imagés par microscopie bi-photonique (cf Figure 1.). Les fluorophores utilisés sont la GFP (*green fluorescent protein*) émise par les bactéries et la TMR (tétraméthylrhodamine) greffée à des lectines se fixant sur certains composants de la matrice polymérique. La microscopie bi-photonique est choisie pour sa capacité de pénétration supérieure à 500 μ m. Elle offre une excellente résolution spatiale sur le plan focal (environ 500nm) mais celle-ci reste faible (3 μ m) dans la profondeur (en z). Plusieurs acquisitions faites à différents angles - et avec un traitement d'image approprié - permettent de récupérer une image de résolution spatiale isotrope.

Un agent de contraste pour rayons X est ensuite introduit dans les capillaires et les milieux poreux afin de procéder à la visualisation par micro-tomographie X. Des méthodes utilisant des agents de contraste comme des micro-billes d'argent³, le 1-chloronaphtalène⁴ et le sulfate de baryum (BaSO₄)⁵ - cf Figure 2. - ont été développées. Chacune présente des avantages et des inconvénients qui limitent, pour l'instant, leur application. Nous nous intéressons ici à l'approche utilisant le BaSO₄ qui permet d'obtenir un fort contraste entre les différentes phases du milieu.

3. Résultats

La suspension de BaSO₄ utilisée est très visqueuse et doit être diluée afin d'éviter un possible endommagement de la structure du biofilm lors de l'injection. En revanche, le BaSO₄ peu concentré tend à sédimenter. Nous utilisons alors un mélange avec du gel d'agarose polymérisant à basse température pour pallier ces problèmes de sédimentation. En effet, celui-ci reste fluide à température ambiante (température d'injection de l'agent de contraste) et, grâce à un effet d'hystérésis important, il ne dé-polymérise ni à température ambiante, ni sous l'influence des rayons X.

La capacité de ce nouvel agent de contraste à récupérer la structure du biofilm est évaluée en comparant les images obtenues par microscopie bi-photonique et par micro-tomographie X sur la croissance de biofilms dans des capillaires en verre. Des architectures similaires sont observées avec les deux méthodes. De plus, des informations, comme la surface et le volume du biofilm, sont aussi extraites et comparées complétant ainsi la validation de cette approche.

Nous montrerons également comment cette méthode permet d'obtenir la distribution du biofilm dans l'espace poral ainsi que la morphologie de biofilms pour différentes conditions de croissance dans des milieux poreux modèles. Les structures poreuses imprimées en 3D, avec un polymère radio-transparent, sont relativement bien maîtrisées (porosité, perméabilité, taille moyenne des pores) offrant ainsi la possibilité d'études quantitatives et reproductibles.

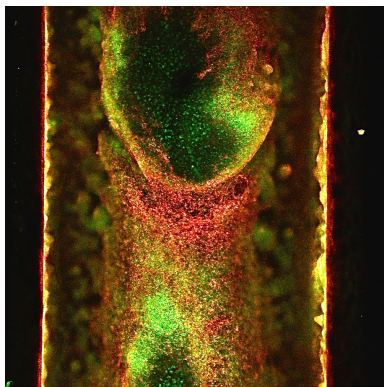


Figure 1. Image de biofilm obtenue par microscopie bi-photonique.

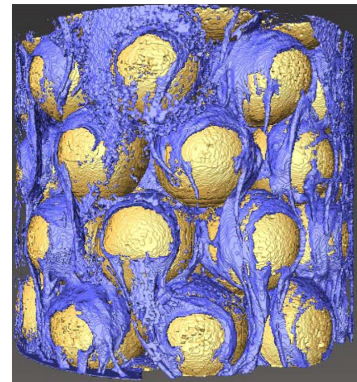


Figure 2. Biofilm en milieux poreux⁶.

Nous remercions Sophie Allart, Danièle Daviaud et Magda Rodrigues pour leur assistance sur le plateau technique d'imagerie cellulaire du Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP INSERM UMR1043).

Références

- [1] Armstrong and Wildenchild, Microbial Enhanced Oil Recovery in Fractional-Wet Systems: A Pore-Scale Investigation, *Transport in Porous Media*, Vol. 92 - Issue 3, pages 819-835 (2012).
- [2] Stoodley et al., Orthopaedic biofilm infections, *Current orthopaedic practice*, Vol. 22 - Issue 6, pages 558-563 (2011).
- [3] Iltis et al., Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography, *Water Resources Research*, Vol. 47 - Issue 2 (2011).
- [4] Rolland du Roscoat et al., Application of synchrotron X-ray microtomography for visualizing bacterial biofilms 3D microstructure in porous media, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 111 - Issue 6, pages 1265-1271 (2014).
- [5] Davit et al., Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography, *Journal of Microscopy*, Vol. 242 - Issue 1, pages 15-25 (2011).
- [6] Iltis et al., The effect of hydraulic loading on bioclogging in porous media: Quantitative results from tomographic imaging, *AGU Fall Meeting*, Poster (2013).